



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Aspectos moleculares de la interacción entre la Proteína Cinasas
A y el GEF P-Rex1 y su relevancia en la transducción de señales
angiogénicas”.**

TESIS QUE PRESENTA

M. EN C. LYDIA CHÁVEZ VARGAS

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA.

Director de la tesis: Dr. JOSÉ VÁZQUEZ PRADO

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2016

Este trabajo estuvo apoyado con la beca 17442 otorgada por el CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). Donativo CONACyT con la beca 17621, para trabajo de proyecto. Grants 152434 (para el Dr. José Vázquez Prado) y 240119 (para la Dra. Guadalupe Reyes Cruz). Además también se tuvo apoyo por parte del laboratorio del Dr. Naoki Mochizuki del National Cardiovascular Center Research Institute en Osaka, Japón.

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. José Vázquez Prado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Vázquez Prado por la dirección del presente trabajo de investigación, especialmente por su apoyo, consejos, comentarios y críticas respecto a mi formación como doctora.

A los doctores Guadalupe Reyes Cruz, Marina Macías Silva, Benjamín Florán Garduño y José Victor Segovia Vila por el seguimiento y sus comentarios en la realización de este trabajo.

A los doctores Naoki Mochizuki y Shigetomo Fukuhara por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el Instituto National Cardiovascular Center Research en Osaka, Japón.

A Estanislao Escobar Islas, David Pérez Rangel, Margarita Raquel Valadez Sánchez y Jaime Estrada Trejo por su apoyo técnico.

A mis compañeros: Jorge Carretero Ortega, Ismael Bracho Valdés, María Luisa Guzmán Hernández, Iliana Ramírez Rangel, Adán Olguín Olguín, Ricardo Hernández García, Evelin Robles Molina, Daniel Cervantes Villagrana, Magda Hernández Vásquez, Sendi Rafael Adame García, Alejandro Castillo Kaul, Victor Manuel Color Aparicio e Irving García Jiménez por su apoyo, colaboración y por el agradable ambiente siempre creado entre todos.

A mi familia, mis padres Julio Chávez y María de la Paz Vargas, mis hermanos Julio Chávez y Paz Chávez, quienes me han brindado amor y apoyo incondicional en todo mi vida.

Gracias a todos ustedes, por siempre darme palabras de aliento y porque me han ayudado a llegar al lugar donde ahora estoy, la etapa final de mis estudios de doctorado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. MIGRACIÓN CELULAR POLARIZADA.....	13
1.2. ANGIOGÉNESIS	15
1.3. GPCRS Y CÁNCER.	18
1.3.1 Estructura y activación.....	20
1.4. GTPASAS DE LA FAMILIA DE RHO.	23
1.4.1 GTPasa Rac.	26
1.5. FACTORES INTERCAMBIADORES DE NUCLEOTIDOS DE GUANINA.....	27
1.5.1 P-REX1 (<i>Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate dependent Rac Exchanger</i>	32
1).	32
1.5.2 Funciones Biológicas de P-Rex1.....	34
1.5.3 Aspectos patológicos relacionados con la función de P-Rex1.....	35
1.5.4 Regulación de P-Rex1.....	35
1.6. PROTEÍNA CINASA A (PKA).....	37
1.6.1 Estructura y regulación de la PKA.....	38
1.6.2 PKA en migración celular.	41
2. JUSTIFICACIÓN	43
3. HIPÓTESIS	44
4. OBJETIVO GENERAL	45
5. OBJETIVOS PARTICULARES	45
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	46
6.1 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.....	47

6.2 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO.....	48
6.2.1 Protocolo A: GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma).....	48
6.2.2 Protocolo B.....	49
6.3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....	50
6.3.1 Protocolo A: GenClean (Q-BIOgene).....	50
6.3.2 Protocolo B: QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN).....	51
6.3.3 Protocolo C: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).....	51
6.3.4 Protocolo D: QIAEX II Agarosa Gel Extraction (QIAGEN).....	52
6.4 MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES.....	53
6.5 TRANSFECCIÓN CELULAR.....	54
6.5.1 Protocolo de transfección en placas P100: (para P35, ver Tabla 5).....	54
6.6 PULL DOWN E INMUNOPRECIPITACIÓN.....	55
6.6.1 Pull down.....	56
6.6.2 Inmunoprecipitación.....	56
6.7 INMUNOBLOT.....	57
6.8 FIJACIÓN CELULAR Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	57
6.9 CIERRE DE HERIDA.....	58
6.10 MIGRACIÓN CELULAR.....	59
6.10.1 Preparación de filtros de policarbonato.....	59
6.10.2 Cosecha de células.....	60
6.10.3 Cuantificación de células.....	60
6.10.4 Ensayo de migración.....	60
6.10.5 Remoción, lavado y tinción del filtro.....	62
6.11 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	63
6.11.1 mCherry:.....	63
6.11.2 pEGFP-C1-P-Rex1:.....	68
6.11.3 Procedimiento de la clonación:.....	70
6.11.4 pmCherry-C1-PRKAR1a:.....	78
6.11.5 shRNA-PRKAR1a (short hairpin RNA-PRKAR1a).....	82
6.11.6 Adición de los sitios XhoI (5') y EcoRI(3') a los oligos del shRNA- PRKAR1a por PCR (Sistema Expand High Fidelity):.....	85
7. RESULTADOS.....	102
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	124

9. PERSPECTIVAS	129
10. REFERENCIAS	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cambios morfológicos de la célula en procesos de migración.	13
Figura 2. Polarización celular.	14
Figura 3. Switch Angiogénico.	16
Figura 4. Proceso de crecimiento tumoral y metástasis.	17
Figura 5. Señalización celular a través de GPCRs.	20
Figura 6. Regulación del ciclo de las GTPasas.	24
Figura 7. RhoGEFs de la familia Dbl.	30
Figura 8. Regulación por interacciones intramoleculares.	31
Figura 9. Regulación por interacción proteína-proteína.	31
Figura 10. Regulación por localización subcelular.	32
Figura 11. Estructura de P-Rex1.....	33
Figura 12. Familia de P-Rex1 RacGEFs.	34
Figura 13. P-Rex1.....	35
Figura 14. Holoenzima PKA.	38
Figura 15. Activación de PKA.	39
Figura 16. Subunidad reguladora de PKA.....	40
Figura 17. Esquematación de hipótesis.	44
Figura 18. Cámara de Boyden.	65
Figura 19. Oligos para pCEFL2-mCherry.....	68
Figura 20. Fragmento correspondiente a mCherry.....	65
Figura 21. Restricción con Bgl II de vector e inserto.....	66

Figura 22. Preparación y purificación de los fragmentos pCEFL2 y mCherry.....	67
Figura 23. Clonas positivas para pCEFL2-m Cherry (1 y 4).....	68
Figura 24. Células HEK293T transfectadas con pCEFL2-mCherry.....	68
Figura 25. Plan de subclonación de P-Rex1 en el vector pEGFP-C1.....	69
Figura 26. Gel diagnóstico para verificar la linearización del vector pEGFP-C1 y la liberación de fragmentos de P-Rex1.....	71
Figura 27. Gel diagnóstico de la inserción del fragmento_1ªparte_P-Rex1 en pEGFP-C1.....	72
Figura 28. Purificación de los fragmentos (digeridos con BamHI / XbaI) pCEFL-EGFP-P-Rex1 y pEGFP-C1-fragmento_1ªparte_P-Rex1.....	74
Figura 29. Gel diagnóstico de pEGFP-C1-P-Rex1 full lenght.....	76
Figura 30. Secuenciación de pEGFP-C1-P-Rex1.....	77
Figura 31. Detección por western blot de la construcción pEGFP-C1-hP-Rex1.....	78
Figura 32. Gel diagnóstico para la digestión de pmCherry-C1-PRKAR1a y pEGFP-C1-PRKAR1a con Bgl II y NheI.....	79
Figura 33. Gel diagnóstico para la nueva construcción de pmCherry-C1-PRKAR1a.....	80
Figura 34. Secuenciación de pmCherry-C1-hPRKAR1a, clona 1.....	81
Figura 35. Secuenciación de pmCherry-C1-hPRKAR1a, clona 2.....	85
Figura 36. Plan de preparación de shRNA-PRKAR1a.....	82
Figura 37. RNAi Codex database.....	83
Figura 38. Oligos para la preparación del shRNA-PRKAR1a.....	85
Figura 39. Gel diagnóstico para verificar la amplificación de shRNA-PRKAR1a (C) y shRNA-PRKAR1a (R).....	86
Figura 40. Purificación de los productos de PCR: shRNA-PRKAR1a (C y R).....	86
Figura 41. Mapa del vector pEn-Emir-C3.....	87
Figura 42. Digestión con XhoI / EcoR1 de pEn_Emir-C3.....	88
Figura 43. Purificación de pEn-Emir-C3 linearizado.....	88
Figura 44. Purificación de shRNA-PRKAR1a (C y R).....	89

Figura 45. Gel para verificar la clonación de los shRNA-PRKAR1a (C y R) en el vector pEn-Emir_C3.	90
Figura 46. Bloqueo de la expresión de HA-PRKAR1a en células HEK293T por diferentes clonas de pEn-Emir_C3-shRNA-PRKAR1a.	91
Figura 47. Plan de subclonación de pEn-Emir_C3-shRNA-PRKAR1a en los vectores lentivirales pDSL_hpIG y pDSL-hpIP.	92
Figura 48. Gel diagnóstico de la restricción con XhoI de pDSL-hpIG-shRNA-PRKAR1a.	94
Figura 49. Gel diagnóstico de la restricción con XhoI de pDSL-hpIP-shRNA-PRKAR1a.	94
Figura 50. Efecto de diferentes clonas de shRNA-PRKAR1a (pDSL-hpIG y pDSL-hpIP) en la expresión de HA-PRKAR1a en células HEK293T.	95
Figura 51. Efecto de diferentes clonas de shRNA-PRKAR1a (pDSL-hpIG y pDSL-hpIP) en la expresión endógena de PRKAR1a en células HEK293T.	96
Figura 52. Bloqueo de la expresión de HA-PRKAR1a en células COS-7 mediante pDSL (hpIP y hpIG)-shRNA-PRKAR1a.	97
Figura 53. Bloqueo de la expresión endógena de PRKAR1a en células COS-7 mediante pDSL (hpIP y hpIG)-shRNA-PRKAR1a.	97
Figura 54. Primers para diferentes subunidades de PKA.	102
Figura 55. Expresión de diferentes subunidades de PKA en las líneas celulares: HMEC, HEK293T y HeLA.	101
Figura 56. Expresión de PRKAR1b, PRKARIIa y PRKAcat_alpha (35 ciclos en PCR).	102
Figura 57. Interacción de Z6 y GST-P-Rex1-PDZ-PDZ en células HEK293T.	103
Figura 58. Interacción de EGFP-PRKAR1a con GST-P-Rex1-PDZ-PDZ en células HEK293T.	104
Figura 59. Interacción de EGFP-PRKAR1a con HA-P-Rex1 en células HEK293T.	105
Figura 60. Mapeo de P-Rex1 en la interacción con 3XF-EGFP-Z6.	106
Figura 61. Mapeo de P-Rex1 en la interacción con EGFP-PRKAR1a.	107
Figura 62. Interacción de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 con la subunidad catalítica alfa de PKA (EGFP-C1-hPRKACA).	108
Figura 63. Interacción endógena entre P-Rex1 y la subunidad reguladora R1a de PKA * ¹	109
Figura 64. Cinética de activación de P-Rex1 en células COS-7 estimuladas con SDF-1 * ¹	110

Figura 65. Efecto de SDF-1 en la interacción de PRKAR1a con P-Rex1.....	111
Figura 66. Asociación de PRKAR1a con GST-Nter-P-Rex1. *1.....	112
Figura 67. Efecto de SDF-1 en la activación MAPK y AKT en células COS-7.....	113
Figura 68. PRKAR1a es reclutada a membrana celular de manera dependiente de P-Rex1 en células COS-7 estimuladas con SDF-1.	114
Figura 69. Reclutamiento a membrana celular de PRKAR1a dependiente de P-Rex1 en células HMEC estimuladas con SDF-1.	115
Figura 70. Activación de MAPK y AKT en células HUVEC estimuladas con SDF-1.....	115
Figura 71. Activación espaciotemporal de Rac en células HUVEC infectadas con el biosensor Raichu X115Rac.	116
Figura 72. Colocalización en membrana celular de P-Rex1 y PRKAR1a en HUVEC estimuladas con SFB 10% y SDF-1.....	117
Figura 73. Cierre de herida de células COS-7 transfectadas con el receptor CXCR4 y estimuladas con SDF-1 sobreexpresando o bloqueando a PRKAR1a.....	118
Figura 74. Efecto positivo de Z6 en migración de células PAE estimuladas con S1P ^{*2}	119
Figura 75. Ensayo de quimiotaxis en cámara de Boyden de células COS-7 en condiciones basales con SDF-1. Efecto del shRNA-PRKAR1a en la migración celular.....	120
Figura 76. Efecto de la activación de PKA sobre P-Rex1 en células COS-7 estimuladas con SDF-1 ^{*1}	121
Figura 77. Efecto de la activación de PKA en la migración de células PAE estimuladas con S1P ^{*2}	127
Figura 78. Efecto inhibitorio de PKA en la migración de células PAE estimuladas con S1P en correlación a la fosforilación de P-Rex1 ejercida por PKA ^{*2}	123

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. GPCRs involucrados en cáncer.	19
Tabla 2. Proteínas G heterotriméricas.	22
Tabla 3. Señalización aberrante de GTPasas de la familia de Rho en cáncer de humano.	26
Tabla 4. RhoGEFs en cáncer de humano.	28
Tabla 5. Reactivos para transfección en cajas p35.	55
Tabla 6. Amplificación de mCherry por PCR (Sistema High Fidelity).	64
Tabla 7. Temperatura de PCR para amplificación de mCherry.	65
Tabla 8. Reacciones de digestión para la preparación de la clonación de mCherry en pCEFL2.	66
Tabla 9. Reacción de ligación pCEFL2 / mCherry.	67
Tabla 10. Restricción de pCEFL-EGFP-P-Rex1 y pEGFP-C1.	70
Tabla 11. Reacción de ligación de pEGFP-C1 con fragmento 1 de P-Rex1.	71
Tabla 12. Reacción de digestión para diagnóstico de la inserción del fragmento_1 ^a parte_P-Rex1 en pEGFP-C1.	72
Tabla 13. Preparación de vectores pEGFP-C1-fragmento_1 ^a parte_P-Rex1 y pCEFL-EGFP-P-Rex1 para posterior ligación.	74
Tabla 14. Reacción de ligación de pEGFP-C1-fragmento_1 ^a parte_P-Rex1 con fragmento 2 ^a parte de P-Rex1.	75
Tabla 15. Digestión diagnóstica de pEGFP-C1-P-Rex1.	75
Tabla 16. Reacciones de digestión con Bgl II y NheI para pmCherry-C1-PRKAR1a y pmCherry-C1.	78
Tabla 17. Reacción de ligación para mCherry y PRKAR1a.	79
Tabla 18. Adición de los sitios XhoI y EcoRI a los oligos del shRNA-PRKAR1a.	85
Tabla 19. Reacciones de digestión (con XhoI / EcoRI) del shRN-PRKAR1a y pEn_Emir-C3.	87
Tabla 20. Reacción de ligación para pEn_Emir-C3 con shRNA-PRKAR1a (C y R).	89
Tabla 21. Reacción de digestión para evaluar la inserción del shRNA-PRKAR1a en el vector pEn_Emir-C3.	90

Tabla 22. Fragmentos obtenidos para la subclonación del shRNA-PRKAR1a en los vectores pDSL-hpIP y pDSL-hpIG.	92
Tabla 23. Reacción de recombinación por Sistema Gateway, pDSL (hpIP y hpIG) con pEn_Emir-C3-shRNA-PRKAR1a.	93
Tabla 24. Primers para diferentes subunidades de PKA.	99
Tabla 25. Reacción para la amplificación de las diferentes subunidades de PKA.	100
Tabla 26. Condiciones de PCR para amplificación de diferentes subunidades de PKA.	100

RESUMEN

El movimiento celular es un evento relevante en procesos fisiológicos y patológicos, ejemplo de ello es la formación y reparación de tejidos, la angiogénesis tumoral y la diseminación de células tumorales. La migración celular y los cambios morfológicos que ocurren al interior de una célula en migración son resultado de la activación de cascadas de señalización que polarizan a la célula. La activación de Cdc42, Rac y RhoA (GTPasas de la Familia de Rho) es importante en la regulación del citoesqueleto de actina, la adhesión y la formación de protrusiones. En células endoteliales, las GTPasas de la familia de Rho son activadas en respuesta a factores angiogénicos con la participación de GEFs, factores intercambiadores de nucleótidos de guanina. Los RhoGEFs, al modular a las GTPasas de la familia de Rho, tienen participación importante en los procesos de remodelación del citoesqueleto. Además de ser integradores de señales, también participan como proteínas *scaffold* teniendo la posibilidad de interactuar con gran número de proteínas y por tanto regulando desde diferentes puntos las cascadas en las que participan. Por lo mencionado anteriormente, los GEFs son considerados proteínas clave y por tanto, importantes blancos terapéuticos. Como la migración celular involucra la activación de GTPasas y GEFs, este evento está sujeto a regulación a través de diversas interacciones y moduladores, como lo son las fosforilaciones ejercidas por cinasas. La activación de la proteína cinasa A (PKA) en eventos migratorios, es un tema interesante de estudio ya que esta enzima tiene la habilidad de modular tanto de manera negativa como positiva al movimiento celular, lo que obedece en gran parte al tipo celular en cuestión. El presente trabajo está enfocado en la asociación de PKA con P-Rex1, un GEF que activa de manera específica a la GTPasa Rac. Este GEF responde a los factores quimiotácticos SDF-1 y S1P. Participa en migración celular embrionaria y está involucrado en cáncer de próstata y mama, así como en procesos metastásicos. En la presente investigación encontramos que P-Rex1 se asocia directamente con la proteína cinasa A (PKA). Esto requiere de los dominios PDZ de P-Rex1 y de la subunidad reguladora de la PKA (PRKAR1a) a través de su segundo dominio de unión a AMPc ubicado en su región carboxilo terminal. Esta interacción genera una modulación bidireccional ya que, por una parte, la PKA es reclutada a la membrana celular cuando P-Rex1 es activado en respuesta a SDF-1 y por otro lado, la PKA fosforila a P-Rex1 ejerciendo una modulación negativa sobre el GEF.

Los hallazgos de este trabajo respecto a la asociación de P-Rex1 con PKA han permitido ampliar el entendimiento sobre la regulación de P-Rex1 en procesos de migración celular al considerar que P-Rex1 lleva consigo a su propio regulador: la PKA, cinasa que al ser activada se encuentra en las condiciones propicias para fosforilar a P-Rex1. Este novedoso mecanismo de regulación espaciotemporal fina controla el movimiento celular, pudiendo ser promovido o frenado de manera eficiente dependiendo de los estímulos que la célula reciba.

ABSTRACT

Cell migration is relevant in physiological and pathological processes, such as tissue repair and wound healing, tumoral angiogenesis and tumoral dissemination of cells. Cell migration and morphological changes that take place inside migrating cells emerge as the result of polarized activation of signaling pathways where Cdc42, Rac and RhoA (Rho GTPases family) play an important role in actin regulation, adhesion and protrusion formation. Rho family GTPases are activated through angiogenic factors where guanine nucleotide exchange factors (GEFs) participate. RhoGEFs have an important participation in cytoskeleton remodeling since they modulate RhoGTPases. RhoGEFs are signaling integrators that also participate as scaffold proteins, interacting with a great number of proteins and regulating signaling pathways from different levels. That's why GEFs are considered key proteins and important therapeutic targets. As cell migration involves activation of GEFs and GTPases, this event is regulated through diverse interactions and modulators, such as phosphorylations exerted by kinases. The role of protein kinase A (PKA) in cell migration is an interesting topic to be investigated as this kinase is a positive or negative regulator of this process, depending on the cell type. The present investigation is focused on the association of PKA with P-Rex1, a GEF which activates Rac GTPase in a specific way in response to SDF-1 and S1P. P-Rex1 participates in embryonic cell migration and is involved in prostate and breast cancer, as well as in metastatic processes. In the present work we found that P-Rex1 interacts with PKA. Specifically, P-Rex1 PDZ domains associate with R1a, the PKA regulatory subunit by recognizing the second cAMP binding domain located at carboxyl terminal region. The complex P-Rex1/PKA sustains a bidirectional mechanism of modulation where PKA is recruited to the cell membrane when P-Rex1 is activated in response to SDF-1 and, reciprocally, PKA phosphorylates P-Rex1, executing a negative modulation over the GEF.

Findings in this research, have revealed a novel mechanism of regulation of P-Rex1, which is relevant in cell migration. Mechanistically, P-Rex1 carries around its own regulator, PKA. Then, this kinase is ready to exert a fine spatiotemporal regulation on P-Rex1. Accordingly cell migration can be promoted or attenuated by this mechanism via the integration of different signals received by the migrating cell.

1. INTRODUCCIÓN

La migración celular es de gran importancia en la vida de un ser viviente pues es un evento que lo acompaña prácticamente durante toda su vida, desde el momento de la concepción hasta la muerte. Este movimiento celular puede observarse en las etapas del desarrollo embrionario en la gastrulación, la angiogénesis, la formación de tejidos y órganos. En la etapa adulta, la migración celular también tiene un papel importante en la renovación de la piel, la reparación de tejido y la respuesta inmune. Sin embargo, el movimiento celular no es exclusivo de eventos fisiológicos, también se presenta en eventos patológicos como las enfermedades vasculares, osteoporosis, artritis reumatoide, retraso mental y cáncer (Ridley et al., 2003). Por lo tanto, entender los mecanismos que orquestan la migración celular es clave en el desarrollo de terapias que puedan frenar o inhibir de manera precisa patológicos procesos que involucran migración celular.

El cáncer es una enfermedad en la que las células cambian de un estado “no móvil” a un estado “móvil”. Es decir, las células proliferan y se mueven de manera descontrolada. Así que el cáncer avanza involucrando procesos de migración celular anormal, considerada un sello característico de células metastásicas con potencial de invasión a otros tejidos. El presente trabajo de investigación parte del interés por esclarecer preguntas respecto a la participación de la proteína P-Rex1 en eventos de migración en el contexto del cáncer, por ello este trabajo se enfoca en el tema de la migración celular.

De manera general, la migración celular se describe como un proceso en el que la célula se polariza formando en su parte frontal, protrusiones (lamelas y filopodios). Estas favorecen el establecimiento de adhesiones con la matriz extracelular que sirven de tracción para el movimiento celular (Lauffenburger & Horwitz, 1996). La figura 1 representa los cambios de una célula que responde a señales de polarización.

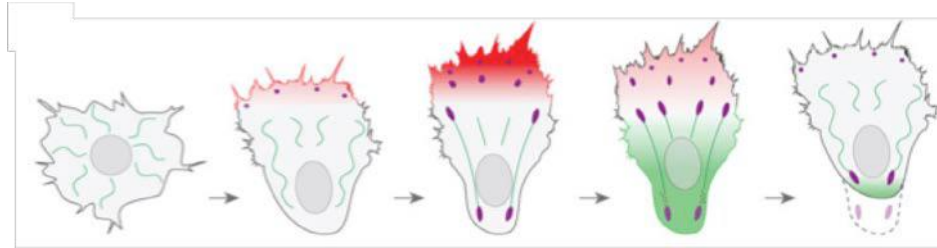


Figura 1. Cambios morfológicos de la célula en procesos de migración.

Diversos agentes quimiotácticos promueven la migración celular polarizada activando cascadas de señalización en las que participan receptores de membrana y diversas proteínas como las GTPasas de la familia de Rho (que son las principales reguladoras de las de protrusiones), los activadores e inactivadores de GTPasas: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) respectivamente, así como complejos proteicos que participan en la formación de estructuras de actomiosina que le sirven a la célula como maquinaria de desplazamiento. Los procesos de migración celular pueden ser regulados a través de fosforilaciones ejercidas por cinasas cuya actividad puede promover o inhibir el proceso migratorio según la cascada de señalización activada. Aunado a lo anterior, el movimiento celular puede estar regulado por zonas específicas dentro de la misma célula, dependiendo de las señales recibidas y la distribución de proteínas de señalización. El proceso migratorio queda sujeto a una regulación muy precisa, de manera que espaciotemporalmente se activarán o apagarán señales provocando cambios morfológicos que acondicionan a la célula para moverse en alguna dirección o bien, frenar el proceso ante determinado estímulo. En los procesos cancerosos la liberación de quimioatrayentes conduce al movimiento celular favoreciendo el avance de células cancerosas y la incorporación de células al estroma tumoral.

1.1. MIGRACIÓN CELULAR POLARIZADA.

Una característica importante de la migración celular es el reacomodo del citoesqueleto coordinado por GTPasas de la familia de Rho. Esto le confiere a la célula una morfología polarizada que la prepara para migrar. La polarización celular se da cuando la célula detecta la presencia de quimiotrayentes. Estos activan receptores de membrana que desencadenan la transducción de señales al interior de la célula activando moléculas y re-

localizándolas de tal manera que provocan un reordenamiento del citoesqueleto de actina. En consecuencia, la célula cambia su forma. Por ejemplo, ante un estímulo quimiotáctico, células en reposo adquieren una forma asimétrica polarizada en donde se distingue claramente un polo de avance (frente) y otro de retracción (parte trasera). Las GTPasas de la familia de Rho: Rac, Rho y Cdc42, junto con las fosfatidil-inositol 3 cinasas (PI3K) son proteínas clave en la migración celular (Barber & Welch, 2006). Estas últimas se encargan del polo de avance de la célula y las GTPasas se encargan de la remodelación del citoesqueleto, confiriéndole polaridad a la célula. En el proceso migratorio, al frente de la célula se activan Rac y Cdc42 que forman lamelas y filopodios respectivamente, mientras que en la parte trasera, acondicionando a la célula para la retracción, se activa la GTPasa Rho, generando, en conjunto, la polaridad celular, lo que se muestra en la figura 2.

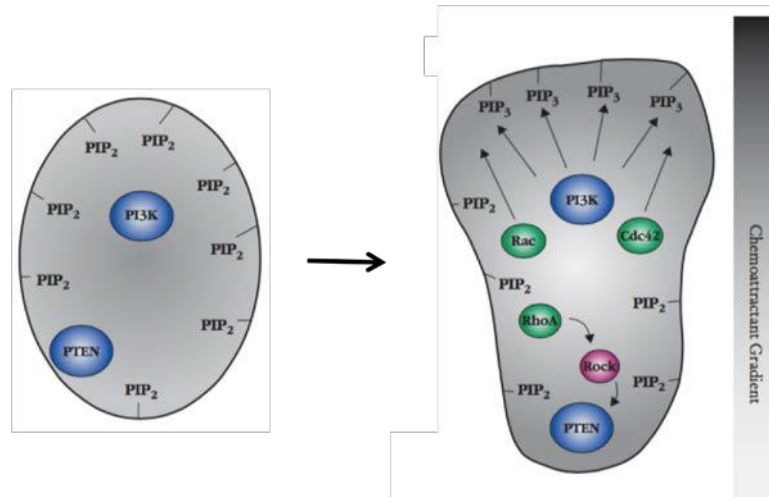


Figura 2. Polarización celular.

La migración celular polarizada se puede describir como un proceso que ocurre en cinco pasos: 1) detección del agente quimioatractivo, 2) formación de protrusiones: lamelas y filopodios, 3) adhesión de las protrusiones a la matriz extracelular (MEC), 4) contracción celular mediada por fibras de estrés, lo que permite el movimiento celular y 6) liberación de la parte trasera de la célula de la MEC y el reciclamiento celular de los materiales de adhesión y señalización. En cada uno de los pasos, son muchas las proteínas que tienen un papel importante en migración celular para que ésta pueda ser eficiente y bien regulada, así que la

ausencia, la sobreexpresión o el funcionamiento anormal de alguna o varias de las proteínas que intervienen en la vía de señalización pueden afectar de manera directa al movimiento celular. El nivel de expresión de proteínas que regulan la polaridad celular así como la localización de éstas son factores que pueden variar en respuesta a señales oncogénicas. Alteraciones en estos grupos de proteínas resultan asociados a procesos de migración aberrante, clave en enfermedades como el cáncer, ya que facilita la invasión y metástasis de células cancerosas a otros tejidos.

1.2 ANGIOGÉNESIS.

Al igual que la migración celular, la angiogénesis es un proceso que se presenta tanto de manera fisiológica como patológica y se describe como la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. La formación de vasos sanguíneos de novo es conocida como vasculogénesis. En este caso, se crea la primera red de vasos sanguíneos a partir de precursores de células endoteliales, a lo que le sucede el proceso de angiogénesis. Durante la etapa adulta del ser humano, generalmente la vasculatura permanece quiescente. Sin embargo, existen procesos de angiogénesis fisiológica en tejidos que requieren cambios, durante la reparación de éstos y, en el caso de la mujer, en órganos reproductivos. A diferencia de la fisiológica, la angiogénesis patológica da lugar a vasos sanguíneos disfuncionales, que son débiles e inestables y cuya maduración es retardada. En estos el flujo sanguíneo es anormal y pueden presentar fugas (Bergers & Benjamin, 2003). Sin embargo, esto no es un problema para el desarrollo del cáncer ya que la formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso clave que favorece el crecimiento de tumores y la metástasis. Un aspecto fundamental en la angiogénesis fisiológica y la tumoral corresponde al balance entre factores pro-angiogénicos (activadores) y anti-angiogénicos (inhibidores) que dictarán si la vasculatura permanece quiescente o sufre cambios. Tales cambios están sujetos a control fisiológico o, por el contrario, ocurren en situaciones de angiogénesis patológica. En cuyo caso sucede lo que se conoce como *switch* angiogénico.

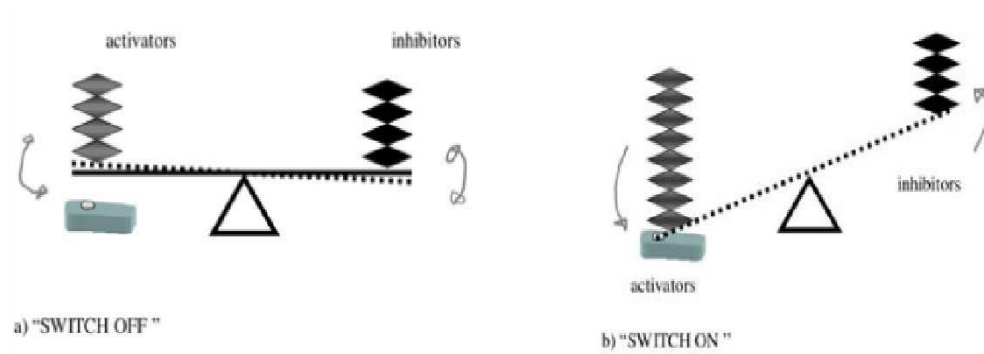


Figura 3. Switch Angiogénico.

Las moléculas activadoras e inhibidoras de la angiogénesis determinan el estado de la balanza, a) en equilibrio el *switch* se encuentra apagado (*switch off*). La inclinación a favor de moléculas activadoras enciende el switch angiogénico (*switch on*). Esto marca el inicio de una serie de cascadas que rápidamente promueven proliferación celular descontrolada acompañada de la destrucción de matriz extracelular, cambiando propiedades celulares de adhesión, favoreciendo la migración y evitando la apoptosis, dando como resultado final el establecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Munoz-Chapuli, Quesada, & Medina, 2004). El *switch* angiogénico se enciende en respuesta a hipoxia. La falta de oxígeno genera la liberación de factores angiogénicos cuando los tumores exceden cierto tamaño (1-2 milímetros). Este hecho favorece el progreso del tumor. Las células tumorales liberan moléculas que atraen a células “normales” como pericitos y células endoteliales adyacentes, además de células del estroma y otras provenientes de la médula ósea, generando así los nuevos vasos sanguíneos, tal como se muestra en la figura 4.

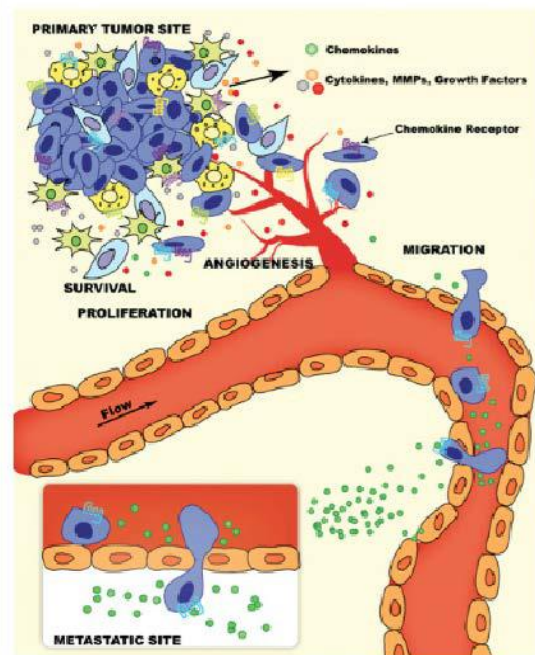


Figura 4. Proceso de crecimiento tumoral y metástasis.

Entre los factores liberados por los tumores o células estromales del *switch* angiogénico se encuentran: 1) factores de crecimiento, ejemplo: VEGF, bFGF, PDGF y EGF; 2) citocinas, ejemplo: interleucina-1, interleucina-6; 3) quimiocinas como CXCL1 y CXCL12 (SDF-1) y 4) metaloproteinasas (MMPs) (Nishida, Yano, Nishida, Kamura, & Kojiro, 2006). De aquí que los receptores para factores de crecimiento, del tipo de cinasas con especificidad por residuos de tirosina (RTKs) que responden a factores de crecimiento, sean de gran interés en el estudio del cáncer como también lo son los receptores que responden a quimiocinas.

La metástasis tumoral da lugar a un pronóstico desfavorable en la progresión del cáncer. Las quimiocinas tienen un papel importante en estos procesos al dirigir la metástasis a órganos específicos (Müller et al., 2001) . Las quimiocinas provocan movimiento celular induciendo cambios en la estructura y dinámica del citoesqueleto, generando la polimerización de actina y finalmente la formación de pseudópodos (Friedl & Wolf, 2003). Aunque son varias las vías por las que las quimiocinas contribuyen a la migración, de particular interés son la vía de señalización de PI3K y la de las GTPasas de la familia de Rho (Rac, Rho y Cdc42).

Los receptores que responden a quimiocinas son receptores transmembranales acoplados a proteína G (GPCRs). Particularmente, el receptor CXCR4 se ha

encontrado sobreexpresado en células de cáncer de mama. Lo mismo que su ligando, la quimiocina CXCL12 (SDF-1), que ha sido implicado en 23 tipos diferentes de cáncer (Balkwill, 2004). Las células que expresan receptores CXCR4 son guiadas hacia gradientes de concentración de SDF-1 generando una nueva colonización de células a distancia del sitio primario. Por lo anterior, se requiere el estudio y comprensión de las cascadas de señalización en las que participan los GPCRs.

1.3 GPCRs y CÁNCER.

Los GPCRs o receptores acoplados a proteína G, nombrados así por sus siglas en inglés (G Protein-Coupled Receptors), pertenecen a una de las familias más grandes de receptores de membrana codificados en el genoma humano. Existen más de 1000 receptores de este grupo, la mayoría de ellos son receptores sensoriales (olfato y gusto). Otros muchos reconocen ligandos como hormonas, neurotransmisores o factores parácrinos, este segundo grupo es muy diverso y está constituido por alrededor de 400 receptores (Wettschureck & Offermanns, 2005). Los ligandos para alrededor de 200 GPCRs han sido identificados. Sin embargo, aún cientos de GPCRs, que han sido llamados receptores huérfanos, permanecen sin haber sido identificados sus ligandos que se les llama receptores huérfanos. Los GPCRs tienen un papel importante en la transducción de señales de múltiples eventos fisiológicos, por nombrar algunos: la embriogénesis, la remodelación de tejidos, la inflamación, la regulación de la presión sanguínea, la contracción del músculo liso, la neurotransmisión, la quimiotaxis, desarrollo celular y la proliferación celular. Los GPCRs son importantes para mantener la homeostasis en los procesos en los que intervienen, sin embargo, su desregulación conduce al desarrollo de diversas patologías (Cotton & Claing, 2009). Por ejemplo, favorecen el crecimiento tumoral y la metástasis. Es por ello que son blanco para el desarrollo de nuevas estrategias basadas en su mecanismo de acción. Se pretende que su caracterización ayude al diagnóstico del cáncer, su prevención y tratamiento. Diversos estudios reportan la sobreexpresión de GPCRs y algunos de sus ligandos, como LPA, S1P y quimiocinas, en diferentes tipos de tumores. Estas alteraciones están involucradas en la transformación celular, proliferación, angiogénesis y metástasis (Lappano & Maggiolini, 2011). Existe evidencia contundente respecto al papel de distintos GPCRs en procesos de iniciación y progresión del cáncer. Diversos mecanismos han

sido asociados a estos eventos, tales como la mencionada sobreexpresión de receptores y ligandos, en células de tumores primarios y metastásicos, tales como células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer pulmonar, de mama y próstata, así como en tumores gástricos, melanoma y en linfomas como se muestra en la siguiente tabla:

Ligand	Receptor	Cancer
Lysophosphatidic acid	Lysophosphatidic acid receptors	<ul style="list-style-type: none"> • Colon cancer⁹⁷ • Ovarian cancer^{73,93,99,157} • Prostate cancer⁷ • HNSCC²⁶ • Breast cancer^{35,38}
Sphingosine 1-phosphate	Sphingosine 1-phosphate receptors	<ul style="list-style-type: none"> • Glioma⁴⁴⁻⁴⁶ • Breast and prostate cancers³³ • Ovarian cancer⁹⁵
Thrombin	Protease-activated receptor 1	<ul style="list-style-type: none"> • Breast cancer^{35,74} • Colon cancer⁷² • HNSCC¹¹ • Prostate cancer¹³
Gastrin-releasing peptide	Gastrin-releasing peptide receptor	<ul style="list-style-type: none"> • HNSCC¹¹ • Lung and pancreatic cancers¹⁸ • Prostate cancer¹⁴
Endothelin 1	Endothelin receptors	<ul style="list-style-type: none"> • Ovarian cancer³⁷ • Colon and prostate cancers³⁶ • Breast cancer^{34,42} • Endometrial cancer³⁶ • Rhabdomyosarcoma³⁸
Prostaglandin E2	Prostaglandin E2 receptors	<ul style="list-style-type: none"> • HNSCC²⁶ • Breast cancer⁷ • Colon cancer¹⁵ • Lung cancer⁷ • Prostate cancer^{7,14}
Bradykinin	Bradykinin receptors	<ul style="list-style-type: none"> • Chondrosarcoma¹⁷⁶ • HNSCC²⁶ • Prostate cancer¹⁴
Chemokine (CXC motif) ligand 12 (also known as stromal cell-derived factor 1)	CXC chemokine receptor 4	<ul style="list-style-type: none"> • Melanoma^{23,58} • Pancreatic cancer²⁹ • Prostate cancer²³ • Breast cancer^{30,73,87} • Ovarian and thyroid cancers²⁵ • HNSCC⁷ • Lung cancer²³ • Neuroblastoma and kidney cancer²⁹
Angiotensin II	Angiotensin II type 1 receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Gastric cancer¹⁷⁵ • Prostate cancer⁹
Interleukin-8	CXC chemokine receptor 2	<ul style="list-style-type: none"> • HNSCC, lung cancer and melanoma⁷
Oestrogen and anti-oestrogen	G protein-coupled oestrogen receptor	<ul style="list-style-type: none"> • Breast cancer⁵⁵⁻⁵⁹ • Ovarian cancer³² • Thyroid cancer⁷¹ • Endometrial cancer^{10,56} • Prostate cancer²⁴
Orexins	Orexin receptor 1	<ul style="list-style-type: none"> • Neuroblastoma, colon and pancreatic cancers³⁴⁵
Hedgehog ligands	Smoothed	<ul style="list-style-type: none"> • Basal cell carcinoma and medulloblastoma¹²⁹ • Prostate, gastrointestinal, haematological cancers and glioma¹¹²
WNT ligands	Frizzled	<ul style="list-style-type: none"> • Colon cancer^{142,145} • Lung cancer^{41,39} • Breast, gastric and thyroid cancers and melanoma¹³⁰

Tabla 1. GPCRs involucrados en cáncer.

Así, la sobreexpresión y mutación de GPCRs desencadena cascadas de señalización que conducen a una transformación oncogénica. Esto involucra procesos de migración celular en la angiogénesis tumoral, de aquí la importancia del estudio de los mecanismos mediante los cuales los GPCRs promueven el movimiento celular.

1.3.1 Estructura y activación.

Los GPCRs son receptores de siete hélices transmembranales que se acoplan a proteínas G heterotriméricas. El papel principal de estas proteínas integrales de membrana es el acople del ligando unido al receptor en el lado extracelular con la activación de una proteína G intracelular. Por lo que de forma específica transmiten una señal extracelular al interior de la célula. Los GPCRs, aunque parecidos entre sí en estructura, tienen efectos únicos en la transducción de señales como resultado del acople a múltiples subtipos de proteínas G (Dorsam & Gutkind, 2007), tal como se muestra en la siguiente figura:

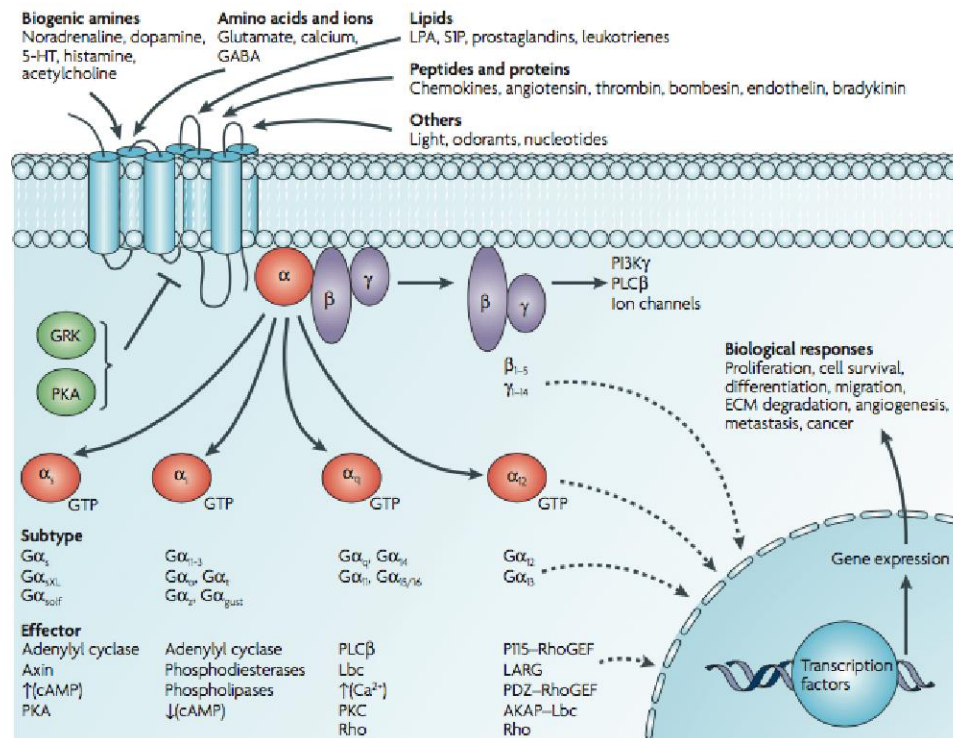


Figura 5. Señalización celular a través de GPCRs.

Los GPCRs asociados con diferentes tipos de cáncer, y que contribuyen al crecimiento tumoral, son activados por moléculas circulantes o ligandos producidos localmente. Una vez que el ligando se une al GPCR, el receptor sufre cambios conformacionales exponiendo sus sitios intracelulares de unión a la proteína G heterotrimérica constituida por las subunidades α , β y γ . Esto provoca que haya un intercambio de GDP unido a la subunidad $G\alpha$, reemplazándolo por GTP, lo que genera la disociación de $G\alpha$ -GTP del heterodímero $G\beta\gamma$. Ambos complejos tienen diferentes efectores que dan origen a diversas cascadas de señalización, que dependen básicamente de la identidad de la proteína G que se encuentra acoplada al receptor. Hay cuatro familias principales de proteínas G heterotriméricas: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$. Cada una de ellas tiene diferentes efectores, como se observa en la siguiente tabla (Wettschureck & Offermanns, 2005).

Name	Gene	Expression	Effector(s)
α-Subunits			
$G\alpha_s$ class			
$G\alpha_s$	<i>GNAS</i>	Ubiquitous	AC (all types) \uparrow
$G\alpha_{sXL}$	<i>(GNASXL)</i>	Neuroendocrine	AC \uparrow
$G\alpha_{sif}$	<i>GNAL</i>	Olfactory epithelium, brain	AC \uparrow
$G\alpha_{i/o}$ class			
$G\alpha_{i1}$	<i>GNAI1</i>	Widely distributed	AC (types I,III,V,VI,VIII,IX) \downarrow (directly regulated)
$G\alpha_{i2}$	<i>GNAI2</i>	Ubiquitous	various other effectots are regulated via $G\beta\gamma$
$G\alpha_{i3}$	<i>GNAI3</i>	Widely distributed	released from activated $G_{i1,3}$ (see below)
$G\alpha_o$	<i>GNAO</i>	Neuronal, neuroendocrine	VDCC \downarrow , GIRK \uparrow (via $G\beta\gamma$; see below)
$G\alpha_z$	<i>GNAZ</i>	Neuronal, platelets	AC (e.g., V,VI) \downarrow (directly regulated); Rap1GAP
$G\alpha_{ioust}$	<i>GNAI3</i>	Taste cells, brush cells	PDE \uparrow ?; other effectors via $G\beta\gamma$?
$G\alpha_{ir}$	<i>GNAI1</i>	Retinal rods, taste cells	PDE 6 (γ -subunit rod) \uparrow
$G\alpha_{ic}$	<i>GNAI2</i>	Retinal cones	PDE 6 (γ -subunit cone) \uparrow
$G\alpha_{q/11}$ class			
$G\alpha_q$	<i>GNAQ</i>	Ubiquitous	PLC- β 1-4 \uparrow
$G\alpha_{11}$	<i>GNAI1</i>	Almost ubiquitous	PLC- β 1-4 \uparrow
$G\alpha_{14}$	<i>GNA14</i>	Kidney, lung, spleen	PLC- β 1-4 \uparrow
$G\alpha_{15/16}$	<i>GNA16 (Gna15)</i>	Hematopoietic cells	PLC- β 1-4 \uparrow
$G\alpha_{12/13}$ class			
$G\alpha_{12}$	<i>GNAI2</i>	Ubiquitous	PDZ-RhoGEF/LARG, Btk, Gap1m, cadherin
$G\alpha_{13}$	<i>GNAI3</i>	Ubiquitous	p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF/LARG, radixin
β-Subunits			
β_1	<i>GNB1</i>	Widely, retinal rods	AC type I \downarrow ; AC types II,IV,VII \uparrow ; PLC- β ($\beta_3 > \beta_2 > \beta_1$) \uparrow ; GIRK1-4 (Kir3.1-3.4) \uparrow receptor kinases (GRK 2 and 3) \uparrow ; PI-3-K, β , γ \uparrow ; T type VDCC (Ca _v 3.2) \downarrow ; (G β_2 , γ 2) N-,P/Q-,R-type VDCC (Ca _v 2.1-2.3) \downarrow
β_2	<i>GNB2</i>	Widely distributed	
β_3	<i>GNB3</i>	Widely, retinal cones	
β_4	<i>GNB4</i>	Widely distributed	
β_5	<i>GNB5</i>	Mainly brain	
γ-Subunits			
γ_{11} γ_{rod}	<i>GNGT1</i>	Retinal rods, brain,	}
γ_{14} γ_{cone}	<i>GNGT2</i>	Retinal cones, brain	
γ_2 γ_6	<i>GNG2</i>	Widely	
γ_3	<i>GNG3</i>	Brain, blood	
γ_4	<i>GNG4</i>	Brain and other tissues	
γ_5	<i>GNG5</i>	Widely	
γ_7	<i>GNG7</i>	Widely	
γ_8 γ_9	<i>GNG8</i>	Olfactory/vomer nasal epithelium	
γ_{10}	<i>GNG10</i>	Widely	
γ_{11}	<i>GNG11</i>	Widely	
γ_{12}	<i>GNG12</i>	Widely	
γ_{13}	<i>GNG13</i>	Brain, taste buds	

AC, adenylyl cyclase; PDE, phosphodiesterase; PLC, phospholipase C; GIRK, G protein-regulated inward rectifier potassium channel; VDCC, voltage-dependent Ca²⁺ channel; PI-3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; GRK, G protein-regulated kinase; RhoGEF, Rho guanine nucleotide exchange factor.

Tabla 2. Proteínas G heterotriméricas.

Como se indica en la tabla anterior, cada una de las diferentes proteínas G puede activar diversos efectores. De manera general, se dice que $G\alpha_s$ -GTP estimula a la adenilato ciclasa, incrementando los niveles de AMP cíclico intracelular (AMPC). La estimulación de G_i se asocia con el aumento del movimiento celular ya que a través de la subunidad $G\alpha$ inhibe a la adenilato ciclasa, disminuyendo el AMPC y a través de $G\beta\gamma$ activa efectores directamente relacionados con la adquisición de polaridad y el establecimiento de sitios de nucleación para la polimerización de actina. Por otra parte, $G\alpha_q$ se une y activa a la fosfolipasa C (PLC) que se encarga de hidrolizar al fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2), generando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Estos segundos mensajeros tienen un papel importante en las vías de señalización dependientes de calcio. Por último, la familia de proteínas G del grupo de $G\alpha_{12/13}$ se asocia a la activación de GTPasas pequeñas de la familia de Rho. Por otro lado, el heterodímero $G\beta\gamma$ desencadena una señalización independiente a la proteína $G\alpha$ activando vías que involucran fosfolipasas, canales iónicos y cinasas como PI3K que sintetiza al segundo mensajero PIP3 a partir de la fosforilación del fosfolípido PIP2. La activación de

PI3K es crucial en eventos de migración celular, ya que es el primer paso que se detecta como el inicio de la polarización celular definiendo la parte frontal o delantera de la célula.

Así, la activación de un GPCR puede dar lugar a una gran diversidad de respuestas dependiendo de la proteína G heterotrimérica a la que se encuentre acoplado y, en consecuencia, de los efectores que tienen cada una de las proteínas G heterotriméricas.

1.4 GTPasas DE LA FAMILIA DE Rho.

Las GTPasas de la familia de Rho tienen un papel importante en la remodelación del citoesqueleto. Participan en la polimerización de actina y en la organización intracelular de microtúbulos. Además, median muchos otros procesos celulares, por ejemplo, participan en cascadas de transducción que generan cambios en la expresión genética y regulan actividades enzimáticas, muchas de ellas involucradas con el metabolismo de lípidos. Dentro de sus funciones biológicas se encuentran la de regular el ciclo celular, participan en la morfogénesis, regulan el tráfico vesicular y son mediadores clave de la polaridad y migración celular (Jaffe & Hall, 2005).

Las GTPasas de la familia de Rho, son proteínas citoplasmáticas pequeñas consideradas como importantes *switches* moleculares que oscilan entre estados encendidos y apagados.

En términos generales, cuando la GTPasa tiene unido GDP se encuentra inactiva y cuando incorpora GTP pasa a un estado activo (Jaffe & Hall, 2005). Este recambio de GDP por GTP es facilitado por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs) que promueven el encendido del *switch*, mientras que las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) estimulan la hidrólisis de GTP apagando de esta manera al *switch* (Bos, Rehmann, & Wittinghofer, 2007). Un grupo adicional de proteínas reguladoras lo constituyen los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDIs) que mediante la unión a la parte carboxilo terminal de la GTPasa la secuestran en el citoplasma, impidiendo su asociación a la membrana y por lo tanto su activación, al alejarlas de GEFs y de sus proteínas blanco (Dovas & Couchman, 2005). La activación y regulación de las GTPasas se muestra en la siguiente figura:

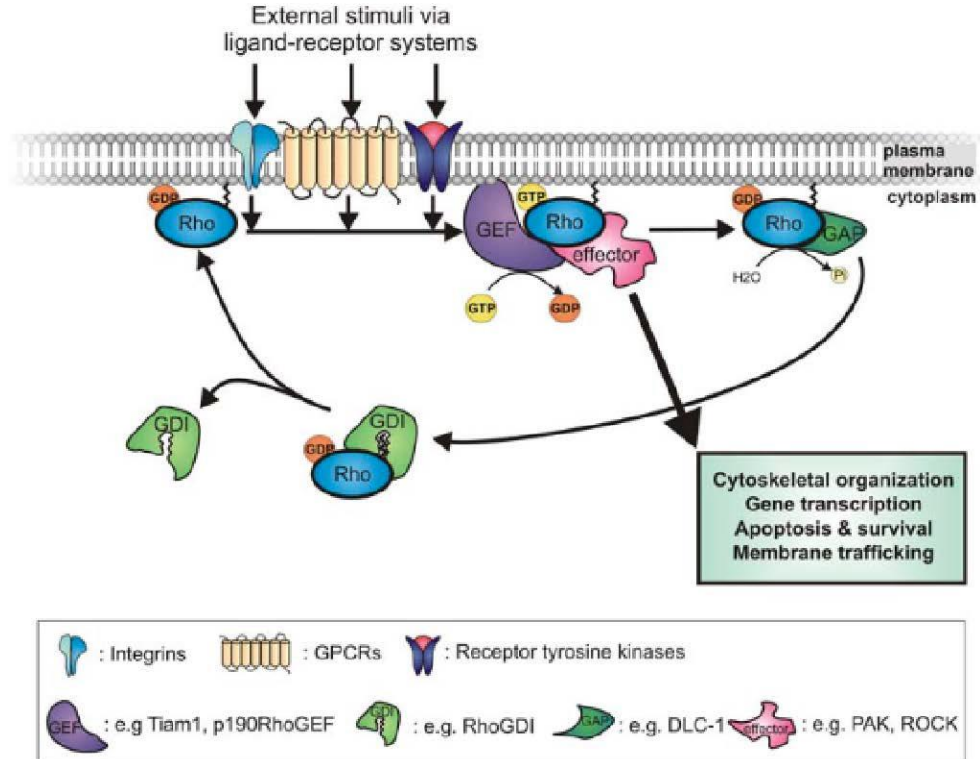


Figura 6. Regulación del ciclo de las GTPasas.

Sólo en el estado activo, las GTPasas se unen con sus proteínas efectoras transduciendo señales provenientes de diferentes receptores de membrana como los receptores para factores de crecimiento del tipo de cinasas de tirosina, receptores de adhesión y los GPCRs. Por el gran número de vías de señalización y procesos fisiológicos en los que participan, no es sorprendente que las GTPasas contribuyan en la alteración de distintos fenotipos celulares en diferentes enfermedades.

Las GTPasas de la familia de Rho son proteínas pequeñas (~ 21 kDa) que pertenecen a la superfamilia de Ras. En este importante grupo también se incluye, además de las GTPasas Ras, a las familias de Rab, Arf y Ran. De acuerdo a datos de la secuencia completa del genoma humano, existen cerca de 20 Rho GTPasas que de acuerdo a sus homologías han sido ordenadas en seis grupos: 1) GTPasas Rho (RhoA, RhoB y RhoC), 2) GTPasas Rac (Rac1, Rac2, Rac3 y RhoG), 3) proteínas parecidas a Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL, Wrch1 y Chp), 4) proteínas Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE), 5) proteínas RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2,

RhoBTB3) y finalmente las proteínas Miro (Miro1 y Miro2) (Ellenbroek & Collard, 2007). La mayoría de la información sobre esta familia de GTPasas proviene de estudios hechos en las más caracterizadas: Rho, Rac y Cdc42. Estas GTPasas tienen una participación importante en un amplio número de procesos celulares, desde regulación del citoesqueleto hasta la regulación de la transcripción genética.

Se sabe que proteínas de la familia de Ras se encuentran mutadas en 30 % de cánceres de diferente origen en el humano (Bos, 1989), lo que hace pensar que pueda estar ocurriendo algo similar con GTPasas de la familia de Rho. Sin embargo, esto no se ha demostrado, lo cual sugiere que la desregulación de estas proteínas sea a nivel de su expresión o en la activación de las GTPasas en donde se ven involucrados los reguladores (GEFs, GAPs y GDIs). Se ha reportado la sobreexpresión de GTPasas de la familia de Rho en cáncer humano así como en líneas celulares provenientes de tumores, ver tabla Tabla 3 (Ellenbroek & Collard, 2007).

Así, cada vez hay mas información respecto a la contribución de las GTPasas en el desarrollo y progresión del cáncer, incluyendo estudios que las asocian a procesos de proliferación celular, sobrevivencia, invasión y metástasis.

El presente trabajo aborda en particular a la GTPasa Rac por ser la GTPasa activada de manera específica por el GEF P-Rex1, objeto de nuestro estudio.

	Alteration	Tumour type
<i>Rho GTPase</i>		
RhoA	Overexpression	Breast, colon, lung, gastric, HNSCC ^a , bladder & testicular cancer
RhoB	Overexpression or downregulation	Breast (overexpression), lung & HNSCC ^b (downregulation)
RhoC	Overexpression	(Inflammatory) breast & metastatic gastric cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma, bladder cancer, NSCLC ^b & HNSCC ^a
Rac1	Overexpression	Breast, gastric & testicular cancer OSCC ^c
Rac1b	Alternative splicing (19 aa insert)	Breast & colon cancer
Rac2	Overexpression	HNSCC ^a
Rac3	Hyperactive or overexpression	Breast cancer
RhoG	Overexpression	Breast cancer
Cdc42	Overexpression	Breast & testicular cancer
RhoH/TTF	Rearrangement and mutations (5' UTR)	Non-Hodgkin's lymphoma & multiple myeloma (rearrangement) & diffuse large B-cell lymphoma (mutation)
Rnd3/RhoE	Overexpression or downregulation	NSCLC ^b (overexpression) prostate cancer (downregulation)

Tabla 3. Señalización aberrante de GTPasas de la familia de Rho en cáncer de humano.

1.4.1 GTPasa Rac.

El papel principal de Rac consiste en regular la dinámica del citoesqueleto de actina. Es importante su participación en el ensamblaje de filamentos de actina necesario para la formación de proyecciones celulares tales como lamelipodios y rufles (Ridley, Paterson, Johnston, Diekmann, & Hall, 1992). Por lo tanto, la actividad de Rac resulta esencial para controlar la morfología, polaridad, adhesión y migración celulares.

La GTPasa Rac, como corresponde al grupo de switches moleculares a que pertenece, oscila entre un estado encendido y uno apagado. El ciclo que regula el estado de activación de la GTPasa Rac depende del efecto de GEFs, GAPs y GDIs. En respuesta a diversos estímulos extracelulares, la GTPasa Rac puede ser activada. Entre los agonistas que activan receptores y cascadas que ejercen un fuerte efecto estimulante sobre esta GTPasas se cuentan factores de crecimiento (por ejemplo EGF, PDGF, bFGF, HGF) y ligandos para GPCRs (CXCL12 o SDF-1, S1P). Se sabe que Rac es activada por los receptores CXCR4, que son GPCRs acoplados a G_i, en respuesta a SDF-1. En este caso, la activación de Rac es catalizada por el GEF P-Rex1. En células endoteliales, esta vía de señalización contribuye a la

migración celular y a la formación *in vitro* de cordones parecidos a vasos sanguíneos (Carretero-Ortega et al., 2010).

Por su importancia en eventos de polaridad y migración celular, la GTPasa Rac puede también contribuir al desarrollo de procesos patológicos que involucran migración celular, tales como la angiogénesis tumoral, la inflamación y eventos de invasión y metástasis. Aunque no se han encontrado mutaciones funcionales de Rac1, sí hay reportes de que se encuentra sobreexpresada en tejidos de cáncer de mama en donde el factor de crecimiento Heregulin β 1 (HRG) provoca la sobreactivación sostenida de Rac1 (Wertheimer et al., 2012). Además de la alteración que Rac genera por su sobreexpresión en procesos cancerosos, es necesario considerar también en esas alteraciones el papel que juegan sus reguladores los GEFs, GAPs y GDIs.

1.5 FACTORES INTERCAMBIADORES DE NUCLEOTIDOS DE GUANINA.

Los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), llamados así por sus siglas en inglés: *Guanine Nucleotide Exchange Factors*, son proteínas que tienen una participación fundamental en la señalización celular. Como efectores que intervienen en las respuestas celulares ante diversos estímulos, los GEFs activan a GTPasas, facilitando el intercambio del nucleótido de guanina GDP, que las GTPasas tienen en su estado inactivo, por GTP, activando de esta manera a la GTPasa.

Gran parte del estudio de los GEFs se ha enfocado en aquellos que regulan a GTPasas de la familia de Rho. A este grupo de GEFs se les denomina RhoGEFs y la especificidad de su reconocimiento varía respecto a las distintas GTPasas: Rho, Rac o Cdc42 y sus homólogos. Los RhoGEFs son pues los antecesores inmediatos a la activación de las GTPasas. Se han identificado aproximadamente 80 RhoGEFs codificados en el genoma humano. Estos comprenden dos familias de GEFs: homólogos a Dbl (*Diffuse B-cell lymphoma*) o bien a Dock (*Dedicator of cytokinesis*). La familia de los GEFs homólogos a Dbl comprende cerca de 70 proteínas que se caracterizan por tener en su estructura dominios DH (*Dbl homology*) correspondientes al sitio catalítico del GEF, seguidos por dominios PH (*Pleckstrin homology*) que en la mayoría de los casos son la parte mínima para tener actividad catalítica como GEF.

La familia Dock está constituida por 11 GEFs que no cuentan con un dominio DH. Sin embargo también tienen la habilidad de activar a GTPasas gracias a la presencia de secuencias conservadas DHR1: *phospholipid binding domain* y DHR2: *Dock homology region 2*, (Goicoechea, Awadia, & Garcia-Mata, 2014). Varios estudios se han enfocado en los RhoGEFs en parte por las funciones biológicas que ellos desempeñan en eventos como: gastrulación, morfogénesis neuronal (participando en los cambios morfológicos por los que las células atraviesan durante estos eventos), desarrollo muscular y respuesta inmune. Ejemplo de ello es la participación de p115RhoGEF en gastrulación, de Vav en la formación de linfocitos, de Trio en la guía del crecimiento axonal y de Tiam1 en la polarización neuronal y formación de neuritas. Por otro lado, se ha mostrado evidencia de la participación de los RhoGEFs en eventos patológicos alterando la proliferación, sobrevivencia, migración e invasión celular entre otras, por lo que tienen una participación importante en diferentes tipos de cáncer (Barrio-Real & Kazanietz, 2012), ejemplos de ello se muestran en la siguiente tabla:

RhoGEF	Tipo de cáncer	Alteración presentada por el GEF	Función
Vav1	Leucemia linfocítica crónica	Sobreexpresión	Sobrevivencia, proliferación o migración celular
P-Rex1	Cáncer de mama	Sobreexpresión	Migración dependiente de Rac vía receptores ErbB y GPCRs
P-Rex2a	Melanoma	Mutaciones puntuales	Aceleración en la formación del tumor
Tiam1	Carcinoma de colon	Sobreexpresión	Invasión y metástasis
Ect2	Cáncer de pulmón	Amplificación de genes y sobreexpresión	Proliferación celular
LARG	Leucemia mieloide aguda	Fusión con el gen MLL	Activación de la vía de Rho
Fdg1	Cáncer de próstata y mama	Sobreexpresión	Asociación con la matriz extracelular

Tabla 4. RhoGEFs en cáncer de humano.

Por su importante participación en procesos fisiológicos y patológicos, elucidar las vías de señalización de los GEFs, ampliar el conocimiento respecto a la forma en que estos funcionan y son regulados, permitirá encontrar desarrollar estrategias para modularlos como blancos terapéuticos. La expectativa es que el bloqueo o manipulación específica de estas proteínas permita frenar el avance de enfermedades como el cáncer en los casos donde los GEFs se encuentren sobreexpresados, mutados o desregulados, de aquí el interés en su estudio.

Los RhoGEFs son proteínas multidominio con estructura muy variada y son activados en respuesta a la presencia de agonistas que estimulan a receptores de membrana, como los receptores para factores de crecimiento que tienen actividad de cinasa de tirosina, los de adhesión y los acoplados a proteínas G heterotriméricas. Además de los dominios DH y PH que los caracterizan, los RhoGEFs pueden contar en su estructura con otros dominios que les confieren determinada localización celular, cierto tipo de regulación y especificidad por determinadas GTPasas o proteínas efectoras. Esto marca la participación del GEF en determinadas vías de señalización celular. La figura 7 muestra GEFs de la familia de Dbl en donde se observan los dominios que los integran, así como la especificidad que tienen por las diferentes GTPasas.

Los RhoGEFs tienen componentes estructurales comunes, como los dominios DH-PH en tándem, aunque no todos los presentan, como es el caso del grupo Dock y otros que no tiene el dominio PH como los GEFs Tuba1, 2 y 3. A pesar de tener dominios en común, el resto de la estructura de los GEFs (RhoGEFs homólogos a Dbl) está compuesta por diferentes dominios que marcan la diferencia y especificidad de cada GEF. Lo anterior explica las diversas formas de activación y regulación de los GEFs (Cook, Rossman, & Der, 2014). Además de su función como factores intercambiadores de nucleótidos de guanina, por sus diferentes componentes estructurales, los GEFs también tienen un papel importante en la localización subcelular de sus proteínas efectoras, así como en la activación espacialmente diferenciada de pools de GTPasas de la familia de Rho.

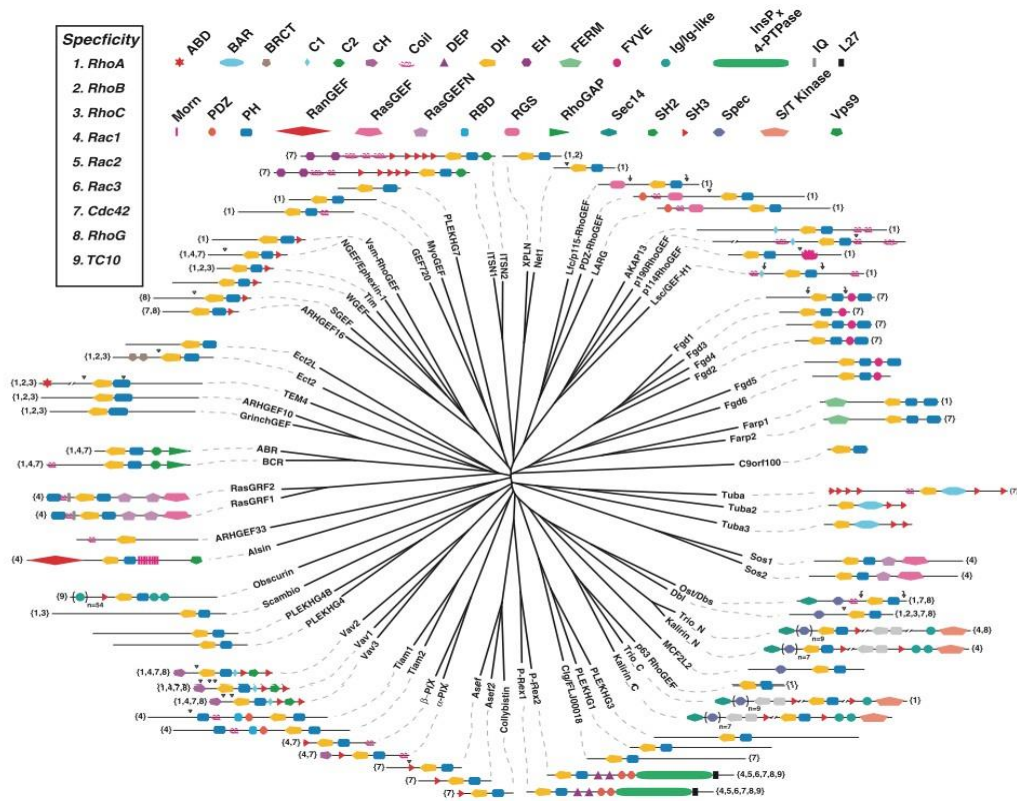


Figura 7. RhoGEFs de la familia Dbl.

Los GEFs, como su nombre hace referencia, catalizan el intercambio de nucleótidos de guanina GDP por GTP en la GTPasa activándola de esta manera. El mecanismo sugerido de dicho intercambio es que se rompe el equilibrio que hay en la interacción de la GTPasa con GDP debido a cambios conformacionales generados por la interacción del GEF con la GTPasa. Esto provoca que la afinidad de la GTPasa por GDP disminuya, permitiendo la liberación de GDP e incorporación de GTP, cuya concentración intracelular es muy alta en comparación con la de GDP (Vetter & Wittinghofer, 2001).

Respecto a la regulación de los GEFs, se conocen algunas maneras en las que se modula su función: regulación inhibitoria por interacciones intramoleculares, regulación por interacción proteína-proteína y regulación por localización (Schmidt & Hall, 2002):

- a. **Regulación inhibitoria por interacciones intramoleculares:** Esta regulación es mediante la propia secuencia del GEF. Es decir, hay regiones del mismo GEF que de alguna manera bloquean su sitio catalítico y por tanto su

actividad es inhibida. Para ser activados, estos requieren de algún tipo de interacción con otras moléculas que generen cambios conformacionales que propicien la disponibilidad del sitio catalítico del GEF. Tal es el caso del Vav1 que requiere ser fosforilado para interactuar con la GTPasa Rac.

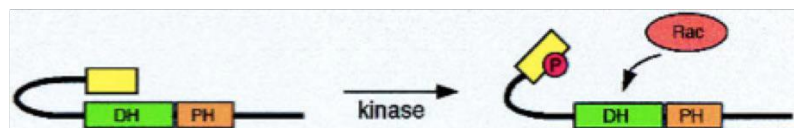


Figura 8. Regulación por interacciones intramoleculares.

- b. Regulación por interacción proteína-proteína:** Esta forma de regulación requiere de la interacción del GEF con otra proteína y difiere de la anterior regulación en que la interacción no participa en la liberación de secuencias inhibitorias intramoleculares. En cambio, provoca la activación o inhibición del GEF. La oligomerización de los GEFs está considerada dentro de este tipo de regulación.



Figura 9. Regulación por interacción proteína-proteína.

- c. Regulación por localización:** Una clave importante de la activación de GEFs está dada por su localización celular, considerando que sus proteínas efectoras pueden encontrarse en sitios subcelulares diferentes, por ejemplo en la membrana plasmática, el núcleo, la mitocondria y el citoesqueleto. Así pues, los componentes estructurales del GEF pueden conferirle especificidad por determinadas proteínas, así como una distribución intracelular en particular que permitiría la modulación fina de vías de señalización en sitios celulares específicos. Un ejemplo específico de esta regulación es cuando los dominios PH del GEF Tiam1 reconocen fosfoinosítidos de membrana como PIP3, producto de la activación de la vía PI3K, generando la relocalización a membrana celular y poniendo de esta manera al GEF disponible cerca de sus proteínas efectoras.

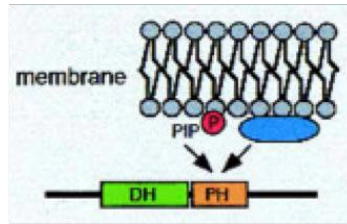


Figura 10. Regulación por localización subcelular.

Por otra parte, es importante conocer la regulación de los GEFs que lleva a su inactivación. Poco se ha estudiado al respecto, sin embargo se plantea que su inactivación puede venir de la acción reversa a su activación. Por ejemplo, si el GEF fue activado por alguna interacción o fosforilación, el hecho de que dicha asociación se pierda, posiblemente por efecto de la asociación con una nueva proteína o por acción de fosfatasa, puede conducir a su inactivación. Además siempre existe la posibilidad de regular al GEF controlando sus niveles de expresión mediante procesos de ubiquitinación y degradación.

Por su carácter multidominio y por ser integradores de señales, los RhoGEFs son particularmente interesantes ya que activan a GTPasas de la familia de Rho y contribuyen de manera indirecta, en procesos como la remodelación del citoesqueleto, en la expresión de genes, la progresión del ciclo celular, el tráfico de membrana y apoptosis (Goicoechea et al., 2014; van Buul, Geerts, & Huvneers, 2014). Además, los GEFs tienen un papel importante como proteínas scaffolds promoviendo la activación de cascadas de señalización. Todas estas características de los GEFs les confieren la posibilidad de regular de manera muy fina y espaciotemporal los procesos en los que se ven involucrados.

Por la participación de RhoGEFs en diversos procesos patológicos y por la oportunidad que ellos ofrecen como blancos terapéuticos, el presente trabajo estuvo enfocado al estudio de un RhoGEF, P-Rex1.

1.5.1 P-REX1 (Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate dependent Rac Exchanger

1).

P-Rex1, nombrado así por sus siglas en inglés, es un factor intercambiador de

nucleótidos de guanina para la GTPasa Rac que fue aislado en el año 2002 a partir de fracciones citosólicas de neutrófilos. Este GEF está conformado por una secuencia de 1659 aminoácidos y tiene un peso de 185 kDa (Welch et al., 2002). El estudio de este GEF resulta muy atractivo por ser una proteína integradora de señales que activa de manera específica a la GTPasa Rac. Esto presupone su participación en diversos procesos celulares, de especial interés, aquellos que se presentan en eventos patológicos como los son los relacionados con el cáncer en donde P-Rex1 representa un potencial blanco terapéutico.

Estructuralmente, P-Rex1 es un GEF conformado por diferentes dominios:

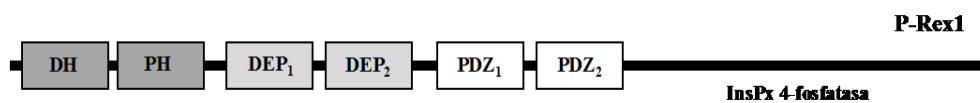


Figura 11. Estructura de P-Rex1.

Cuenta con dominios en tándem DH-PH, en donde DH (*Dbl homology*) es el dominio catalítico del GEF que se encarga de activar a la GTPasa promoviendo el intercambio del GDP unido a ella por GTP, llevándola a un estado activo. El dominio PH (*Pleckstrin homology*) tiene un papel importante en la activación del GEF a través de PtdIns(3,4,5)P₃. Le siguen dos dominios DEP-DEP (*Disheveled, EGL-10 and Pleckstrin homology*) que, se sabe de manera general, pueden facilitar las interacciones con las proteínas blanco. En la región amino terminal se encuentran además dos dominios PDZ (*Post-synaptic Disc-large Zonula occludens 1 homology*) que son conocidos por sus amplias funciones como adaptadores que facilitan la interacción con otras proteínas (Hill et al., 2005). La región carboxilo terminal de P-Rex1 tiene alta similitud a la 4-fosfatasa Inositol polifosfato (InsPx 4-fosfatasa). Sin embargo, los estudios hechos para evaluar su función como fosfatasa han resultado negativos (Welch et al., 2002).

P-Rex1 pertenece a la familia de Rac GEFs conformada por otros dos miembros, P-Rex2a (183 kDa) y P-Rex2b (136 kDa), este último con secuencia mas corta que la de los otros debido a que la parte carboxilo terminal no cuenta con la región parecida a InsPx 4-fosfatasa.

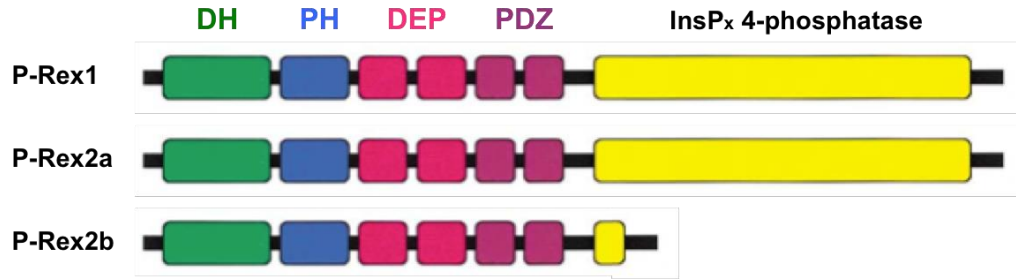


Figura 12. Familia de P-Rex1 RacGEFs.

Tanto P-Rex1 como P-Rex2 pueden ser activados de manera dual por el heterodímero beta gama ($G\beta\gamma$), así como por el segundo mensajero fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato (PtdIns(3,4,5) P3) y esta interacción es sinergizada cuando están presentes ambos estímulos (Welch et al., 2002). La existencia de P-Rex1 y P-Rex2 con funciones similares es explicada por su expresión diferencial, P-Rex1 se expresa principalmente en neutrófilos, cerebro, vaso y nódulos linfáticos; recientemente se encontró que P-Rex1 se expresa de manera abundante en células endoteliales mientras que P-Rex2a se expresa en músculo esquelético, neuronas Purkinje y pulmón, por otro lado, P-Rex2b se expresa en corazón y células endoteliales (Donald et al., 2008; Welch et al., 2002; Yoshizawa et al., 2005; Hernández-García et al., 2015).

1.5.2 Funciones Biológicas de P-Rex1.

P-Rex1 destaca por su importancia en procesos de migración celular. El análisis de cerebros de ratón a lo largo de diferentes etapas de desarrollo mostró una expresión dinámica de P-Rex1 participando en migración neuronal en el desarrollo del sistema nervioso (Yoshizawa et al., 2005). En células PC12 estimuladas con el factor de crecimiento nervioso (NGF), P-Rex1 incrementa la activación de Rac, la formación de rufles y la migración celular. Se ha sugerido además la participación de la familia de P-Rex1 en procesos de desarrollo cerebral. Esto de acuerdo a estudios en ratones knockout tanto para P-Rex1 como para P-Rex2, en los que se presentan diferencias en la morfología de dendritas (reducción de tamaño), así como defectos en la coordinación motora (Donald et al., 2008).

Estudios en células PC12 estimuladas con NGF muestran a P-Rex1 como un regulador negativo en la diferenciación de neuritas. Esto a través de la GTPasa Rac3 que, a diferencia de

Rac1, regula negativamente la extensión de las neuritas (Waters et al., 2008).

1.5.3 Aspectos patológicos relacionados con la función de P-Rex1.

Conocer los eventos en los que P-Rex1 participa de manera fisiológica, hace plantear que este GEF pudiera estar involucrado en situaciones en las que se encontrara desregulado, inhibido o sobreexpresado y, en efecto, así se ha demostrado. Se ha descrito que la expresión de P-Rex1 en tumores humanos correlaciona con un mal pronóstico de sobrevivencia (Seoane, Montero, Ocaña, & Pandiella, 2010). Además, se ha demostrado que P-Rex1 promueve metástasis en cáncer de próstata (Qin et al., 2009). Así mismo, se sabe que es un mediador esencial en cáncer de mama y se sugiere que promueve el crecimiento celular, la migración y tumorigénesis (Sosa et al., 2010). De igual manera se ha reportado la participación de P-Rex1 en melanoma humano, en donde se sobreexpresa y se ve involucrado en migración celular y progresión de cáncer a metástasis (Lindsay et al., 2011).

1.5.4 Regulación de P-Rex1.

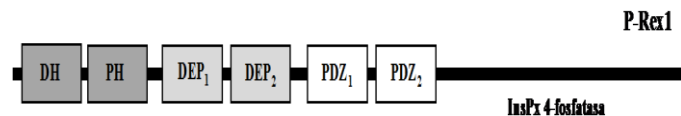


Figura 13. P-Rex1.

P-Rex1 al ser una proteína integrada por dominios DH, PH, DEP y PDZ, se convierte en un GEF muy atractivo para su estudio desde el punto de vista dinámico. Es de esperarse que tenga una gran diversidad de efectores a los que posiblemente regule y por los que sea regulado, sin embargo no es mucho lo que se sabe al respecto.

Como se mencionó anteriormente, P-Rex1 se activa de manera sinérgica a través del heterodímero Gbeta gama ($G\beta\gamma$) y también por el segundo mensajero fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato (PtdIns(3,4,5,) P₃). Esto lo hace un GEF con coincidencia en la integración de señales provenientes de GPCRs (acoplados a Gi) y de receptores para tirosin-cinasa (RTKs). Está reportado que P-Rex1 lleva a la activación de Rac a través de ellos promoviendo metástasis en cáncer de próstata (Qin et al., 2009). Se ha demostrado que P-Rex1 se activa en

la cascada de los receptores CXCR4, acoplados a Gi. En respuesta al factor 1 derivado de células estromales (SDF-1/CXCL12), CXCR4 promueve la activación de P-Rex1 y lleva a la GTPasa Rac a un estado unido a GTP, facilitando la migración celular. En células endoteliales, esto lleva a la formación de estructuras tipo capilar, lo que refuerza a P-Rex1 como un GEF que puede llevar a respuestas angiogénicas.

Se sabe acerca de los dominios PH que son reconocidos por PIP3, lo que sugiere la localización de P-Rex1 en la membrana celular facilitando la interacción con proteínas efectoras que se encuentren cercanas a la membrana celular. Este hecho ha quedado demostrado en neutrófilos estimulados con un agente quimiotáctico en donde P-Rex1 es reclutado a membrana celular colocalizándose con su efector Rac2 (Zhao et al., 2007). En el 2007 se reportó que los dominios DEP1 y DEP2 de P-Rex1 interaccionan con el blanco a rapamicina mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*), una cinasa serina-treonina que regula el crecimiento celular, proliferación y migración celular. La asociación de los dominios DEP de P-Rex1 con mTOR llevan a la activación de Rac en respuesta a aminoácidos (Hernández-Negrete et al., 2007). Respecto a los dominios PDZ, se sabe de manera general que se pueden asociar con el carboxilo terminal de otras proteínas, entre ellas receptores acoplados a proteínas G y canales, además de interaccionar con otros dominios PDZ (Jeleń, Oleksy, Śmietana, & Otlewski, 2003). En el caso particular de los dominios PDZ de P-Rex1 se encontró que interaccionan con el carboxilo del receptor para esfingosina 1 fosfato (S1P1), asociación que facilita la migración en células transfectadas con ambas proteínas (Ledezma-Sánchez, García-Regalado, Guzmán-Hernández, & Vázquez-Prado, 2010).

Los diferentes dominios que conforman a P-Rex1 contribuyen a modular su actividad. P-Rex1 se auto regula via interacciones intramoleculares mediante la asociación de los dominios DEP2 y PDZ1 con la región carboxilo terminal del GEF. Se ha propuesto que esta conformación es importante para que P-Rex1 pueda ser activado por Gbeta gama (Daisuke Urane- Hiroshi Itho, 2008). Este mismo grupo reportó que la actividad Rac GEF de P-Rex1 dependiente de Gbeta gama es inhibida por la proteína cinasa A (PKA) mediante fosforilaciones en el GEF, regulación negativa que ya había sido descrita con anterioridad en experimentos *in vitro* en donde las fosforilaciones por PKA sobre P-Rex1 disminuyeron la activación de Rac. Por otra parte, recientemente se describió que el efecto inhibitorio de PKA sobre P-Rex1 está dado por una serie de pasos que implican la asociación de P-Rex1 a través de

sus dominios PDZ con dicha cinasa, facilitando así, su regulación a través de fosforilaciones que propician interacciones intramoleculares que afectan el sitio DH-PH de P-Rex1 y en consecuencia, su actividad catalítica (Chávez-Vargas et al., 2016).

La regulación de P-Rex1 por PKA no ha sido estudiada a fondo, aún no se han elucidado los mecanismos para esta regulación. Al momento tan sólo se sabe que un aumento en los niveles de AMPc activan a PKA y que ésta fosforila en sitios aún no definidos, a P-Rex1. Lo anterior lleva inmediatamente a preguntarse sobre las circunstancias bajo las cuales PKA regula a P-Rex1.

1.6 PROTEÍNA CINASA A (PKA).

La proteína cinasa dependiente de AMP cíclico, proteína cinasa A o PKA (*cyclic AMP-dependent Protein Kinase*) fue la segunda cinasa en ser descubierta (Walsh, Perkins, & Krebs, 1968) y la primera en ser secuenciada y cristalizada. Esto ha facilitado la comprensión sobre el funcionamiento y organización general de las cinasas. PKA es una proteína ubicua que participa en muchas cascadas de señalización interaccionando con innumerables efectores. Por lo tanto, esta cinasa regula una gran variedad de procesos biológicos, lo que explica el interés elevado en ella. Aunque los estudios sobre PKA han sido extensos, falta mucho trabajo por hacer debido a su complejidad, ya que se trata de un tetrámero.

Pese al avance en cuanto el estudio de la PKA, se requiere aún profundizar de manera detallada en cuanto a las funciones que desarrolla, su regulación, sus proteínas efectoras, así como los eventos particulares en los que participa como son la modulación de otras cinasas, la regulación de la concentración de calcio intracelular, la regulación del metabolismo, la transcripción, la diferenciación y la proliferación celular, entre otros. Algunos de los procesos biológicos en los que PKA está involucrada son la regulación de las funciones cardiovascular, reproductiva, de procesos de exocitosis y endocitosis y de funciones del sistema inmune, por mencionar algunos. Así, la PKA pertenece a la gran familia de proteínas cinasas que regulan una plétora de procesos biológicos. Por lo mismo, está relacionada con muchas enfermedades, lo que hace muy interesante su estudio. Se ha abordado a la PKA desde diferentes puntos: su estructura, regulación por sus proteínas efectoras y procesos en los que participa, entre otros. La estructura de la PKA se ha estudiado mediante cristalización (inicialmente con el sitio

catalítico), lo que ha brindado amplio conocimiento en cuanto a los cambios conformacionales que la cinasa sufre al ser activada. Esto ha revelado que prácticamente la molécula completa participa en la activación y asociación con proteínas blanco.

Para entender por completo la señalización de la PKA es necesario considerar varias proteínas que se relacionan con ella, tales como los AKAPs que sirven como proteínas scaffold para la cinasa. Además, es importante profundizar en el entendimiento de las propias proteínas o subunidades que la constituyen: las catalíticas y las reguladoras.

1.6.1 Estructura y regulación de la PKA.

La PKA es una holoenzima que consiste de dos subunidades reguladoras y dos catalíticas, como se muestra en la figura 14. Existen cuatro isoformas de la subunidad reguladora, conocidas como R α , R β , RII α y RII β y tres para la catalítica C α , C β y C γ cuya expresión depende del tipo de tejido (Taylor, Ilouz, Zhang, & Kornev, 2012).

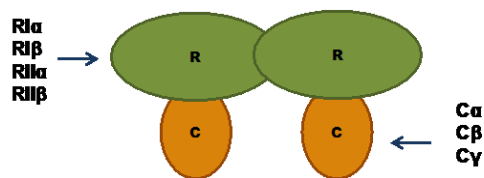


Figura 14. Holoenzima PKA.

La cinasa PKA es una enzima capaz de interactuar con un gran número de proteínas. Si bien se dice que es muy promiscua, en realidad tiene especificidad por sus sustratos. Esta especificidad puede estar mediada por la expresión celular de las diferentes subunidades reguladoras y catalíticas de la PKA en tejidos. Además, los mecanismos que controlan su localización subcelular, dada por proteínas de anclaje de la cinasa A, llamadas AKAPs tienen un efecto definitivo en el acceso a sustratos que eventualmente son fosforilados.

La PKA se activa en respuesta a un aumento de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Esto depende de la estimulación de receptores acoplados a proteína G que desencadenan un aumento de los niveles intracelulares de AMPc. Cuando el GPCR está acoplado a G s , la proteína transmembranal adenilato ciclasa (AC) es activada, generando AMPc. En tanto que los GPCRs acoplados a G i inhiben a la AC, lo que lleva a una

disminución en los niveles de AMPc y, por tanto, la vía de la PKA se regula de manera negativa. La activación de la PKA ocurre cuando los niveles intracelulares de AMPc aumentan como se muestra en la figura 15:

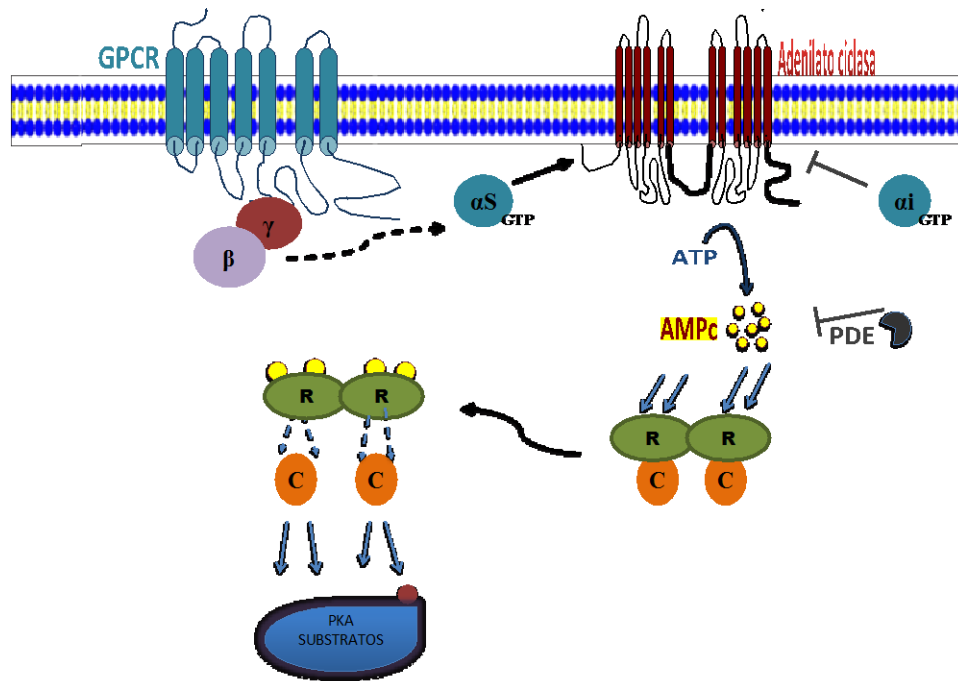


Figura 15. Activación de PKA.

La activación de PKA se da una vez que aumentan los niveles intracelulares de AMPc que al unirse a las subunidades reguladoras de esta cinasa liberan la autoinhibición del tetrámero, quedando las subunidades catalíticas libres para interactuar con sus proteínas efectoras. De esta forma, la PKA regula diversas vías de señalización mediante fosforilaciones. Por otro lado, la señalización de PKA es regulada negativamente por acción de fosfodiesterasas que degradan el AMPc (Taskén & Aandahl, 2004).

Las subunidades reguladoras de la PKA son las encargadas de unir al AMPc a través de sus dos dominios de unión que reconocen a este nucleótido cíclico. Tales dominios están presentes en la región carboxilo terminal. El mecanismo consiste en que dos moléculas de AMPc, unidas a la subunidad reguladora, dan lugar a un cambio conformacional drástico que provoca el desacople con las subunidades catalíticas. Como resultado, se libera la inhibición del tetrámero y quedan libres las subunidades catalíticas para interactuar con sus proteínas

efectoras, a las que podrá regular mediante fosforilaciones (Kim, Cheng, Saldanha, & Taylor, 2007). Por otro lado, la señalización de la PKA es regulada negativamente por acción de fosfodiesterasas que degradan al AMPc (Taskén & Aandahl, 2004).

Existen dos isoformas de la proteína cinasa A: PKA I que es predominantemente citoplasmática, con alta afinidad por AMPc y, PKA II que se vincula con estructuras celulares y organelos (Michel & Scott, 2002). Esta clasificación ha sido establecida en base a la subunidad reguladora asociada a la catalítica. Se trata de PKA I cuando las subunidades reguladoras que la constituyen son del tipo RI y, PKA II cuando las subunidades reguladoras son de la isoforma RII. De manera general se describe a las subunidades reguladoras como proteínas conservadas que incluyen un dominio de acoplamiento y dimerización (D/D). Este se ubica en la parte amino terminal, seguido por una región linker y dos dominios CNB (cyclic nucleotide- binding domains) en tándem, ubicados en el carboxilo terminal y que corresponden a los dominios en donde se asocia el AMPc. La estructura se muestra en la siguiente figura (Taylor et al., 2012):



Figura 16. Subunidad reguladora de PKA.

Dada la complejidad en la estructura de la PKA, considerando que puede estar conformada por una gran combinación de isoformas respecto a las subunidades que la integran, además de los aspectos que determinan la localización subcelular de ellas y a la expresión diferencial en tejidos tanto de las subunidades reguladoras como catalíticas, además de los múltiples efectores de PKA, es por demás evidente el gran número de vías de señalización que esta cinasa puede regular.

Un nivel de complejidad mayor es propiciado por la acción de los AKAPs, que son proteínas de anclaje de la cinasa A que juegan un papel muy importante en la señalización de esta enzima, ya que la ubican en sitios subcelulares específicos, compartimentalizando la señalización en la que ésta interviene (Dell'Acqua & Scott, 1997). Los AKAPs son un grupo de proteínas estructuralmente diferentes pero con la habilidad común de asociarse a las subunidades reguladoras de la PKA (unión que se reporta sucede en la parte amino-terminal) (Newlon et al., 1999). El anclaje de los AKAPs con la PKA da pauta a una regulación fina

dependiente de gradientes de AMPc y que finalmente genera que la activación de PKA sea eficiente y precisa respecto a su proteína efectora. Por ello, los AKAPs son un punto de anclaje que ayuda integrar varias vías de señalización. Se ha reportado que los AKAPs se anclan principalmente con las subunidades RII y hay pocos ejemplos de AKAPs que se asocien a la PKA mediante las subunidades RI (Huang, Durick, Weiner, Chun, & Taylor, 1997). También existen AKAPs con la capacidad de unirse de manera dual a RI y RII (Huang et al., 1997).

Por todo lo anteriormente mencionado, es de esperarse que la PKA esté involucrada en diversas patologías, entre ellas el cáncer. Se ha reportado la correlación entre la expresión diferencial de PKA I y PKA II en procesos de diferenciación celular y transformación neoplásica. En el caso de PKA I, específicamente en relación con la subunidad reguladora RI α , ésta se ha encontrado sobreexpresada en líneas celulares provenientes de cáncer de humano y en tumores primarios desencadenados por factores de crecimiento como TGF α . Además, la sobreexpresión de RI α está asociada con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (Tortora & Ciardiello, 2002). Estos son sólo unos ejemplos de patologías en las que la PKA está involucrada. Resulta evidente que, dada su importancia, la lista de ellos es mucho más larga y dista de conocerse por completo. Por eso, en este trabajo se abordó a la PKA únicamente en procesos de migración celular.

1.6.2 PKA en migración celular.

La vía de señalización de la PKA ha sido implicada en la regulación de la migración celular endotelial en sentido positivo y también negativo (Bakre et al., 2002). Es decir, algunos datos indican que la PKA promueve el movimiento celular, mientras que en otros casos su participación ayuda a frenar o inhibir procesos migratorios.

Entre los mecanismos que explican la regulación dual que ejerce la PKA en procesos de migración celular está la asociación con proteínas clave para el movimiento celular. Aunado a esto, se encuentran los AKAPs que tienen un papel muy importante en la ubicación celular de la PKA, localizándola junto a sus proteínas efectoras y, por tanto, generando una respuesta restringida de manera espaciotemporal. Además, hay que considerar que las respuestas a la activación de la PKA también dependen del tipo celular en el

que se lleva a cabo determinado proceso.

En fibroblastos, el aumento en los niveles de AMPc inhibe la activación de Rac y la formación de lamelipodia (Qin et al., 2009). Por otro lado, en la parte frontal de células en migración se ha visto que la PKA, tanto sus subunidades reguladoras como su actividad, se ve enriquecida promoviendo así la migración celular (Howe, Baldor, & Hogan, 2005). Entre las proteínas que regulan la dinámica del citoesqueleto, y a las que se asocia la PKA, se incluyen RhoGEFs como Lbc que funciona como un AKAP. En este caso, la activación de la GTPasa Rho es inhibida vía la interacción Lbc-PKA y la intervención de proteínas 14-3-3 (Diviani, Baisamy, & Appert- Collin, 2006).

2. JUSTIFICACIÓN

La angiogénesis tumoral es un proceso que acelera el desarrollo del cáncer. La caracterización de este proceso ha dado lugar al diseño de terapias antineoplásicas, como las basadas en el uso de anticuerpos contra el factor de crecimiento de endotelio vascular, útiles en algunas situaciones. Sin embargo, la complejidad de eventos moleculares involucrados en este proceso patológico ofrece un amplio potencial para desarrollar múltiples estrategias particulares de tratamiento basadas en el conocimiento básico de estos procesos. La migración celular es uno de tales procesos. Esta depende de GEFs que activan a GTPasas de la familia de Rho. Puesto que el movimiento celular que involucra desplazamiento y cambios en la forma celular para dar lugar a la formación de un nuevo capilar en los vasos sanguíneos tumorales requiere de RhoGEFs, hemos considerado que particularmente P-Rex1, una proteína multidominio que activa a Rac y que participa en procesos de angiogénesis en respuesta a estímulos mediados por receptores acoplados a proteínas G con propiedades angiogénicas, debe ser caracterizado como un posible blanco terapéutico aplicable en el tratamiento del cáncer. Además, teniendo como antecedente el hallazgo de la asociación de este GEF con la subunidad reguladora R1a de la PKA, cinasa que regula una miríada de eventos, entre ellos la migración celular, saltaba a la vista la gran posibilidad de repercusiones funcionales dependientes de las interacciones entre ambas proteínas. Entre éstas, consideramos particularmente la posibilidad de que P-Rex1 y PKA estuvieran ejerciendo una regulación recíproca en eventos migratorios, sugiriendo la existencia de un mecanismo fino de regulación. El entendimiento de lo que implica la participación, en una misma vía, de tan importantes proteínas en la regulación de procesos de migración celular polarizada, abre la posibilidad de generar estrategias que permitan frenar o inhibir los eventos en los que ellos son clave para la migración celular y angiogénesis. Así, el presente trabajo busca en primer lugar encontrar y comprobar en un modelo celular la asociación entre P-Rex1 con la PKA y en segundo lugar entender y explicar los mecanismos que se llevan a cabo cuando hay señales angiogénicas que le dan indicaciones a una célula de moverse, orquestándose una serie de eventos que finalmente darán origen a nuevos vasos sanguíneos que serán fundamentales para proveer a los tumores de nutrientes y favoreciendo la proliferación celular, la metástasis y el cáncer.

3. HIPÓTESIS

La proteína cinasa A regula al GEF P-Rex1 mediante interacciones directas afectando las funciones endoteliales de este GEF relacionadas al proceso de angiogénesis.

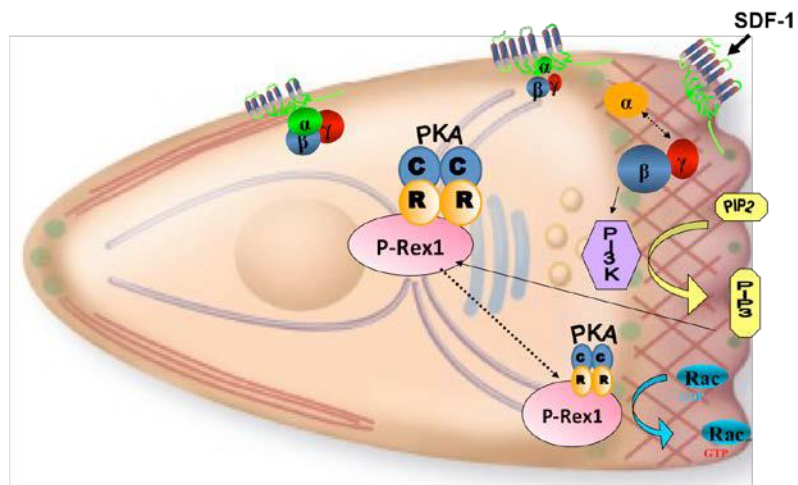


Figura 17. Esquematación de hipótesis.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la interacción entre el GEF P-Rex1 y la proteína cinasa A, estudiar la relevancia de esta interacción en eventos relacionados con la migración celular polarizada.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- I.** Caracterizar la interacción entre el GEF P-Rex1 y la proteína cinasa A, particularmente la subunidad reguladora PRKAR1A, en células de mamífero.
- II.** Evaluar el efecto del factor derivado de células estromales (SDF-1) en la asociación de P-Rex1 y la subunidad reguladora PRKAR1a.
- III.** Estudiar la regulación de P-Rex1 por PKA y sus efectos en procesos de migración celular polarizada.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para investigar la importancia de la asociación entre el GEF P-Rex1 y la proteína cinasa A en procesos de migración celular polarizada relacionados con angiogénesis, el presente trabajo se abordó en dos partes: 1) se caracterizó la interacción P-Rex1/PKA partiendo de la asociación inicialmente encontrada en el ensayo del doble híbrido en levaduras (Y2H) entre los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 con una región del carboxilo de la subunidad reguladora tipo 1 alfa de la PKA, específicamente con el segundo dominio de unión a AMP cíclico de PRKAR1a. A lo que le siguió la evaluación de otras interacciones entre las correspondientes proteínas completas, considerando también la interacción de P-Rex1 con la subunidad catalítica alfa de PKA y 2) se evaluó la dinámica de la interacción entre P-Rex1/PKA bajo el estímulo del factor derivado de células estromales SDF-1 que activa a P-Rex1, así como el efecto de forskolina, activador de la adenilato ciclasa que genera la formación de AMP cíclico, importante para la activación de la PKA.

- I. Caracterización de la interacción de P-Rex1 con la proteína cinasa A, con especial énfasis en la subunidad reguladora PRKAR1a: la asociación encontrada en levaduras en el ensayo del doble híbrido entre los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 con el fragmento de PRKAR1a denominado Z6, se reprodujo en células HEK293T. Se hicieron mapeos para investigar los sitios de interacción en P-Rex1 con Z6 así como con la proteína completa de la subunidad reguladora PRKAR1a y también se evaluó la interacción de P-Rex1 con la subunidad catalítica alfa de la PKA, PRKACA. En esta etapa se utilizaron técnicas como pull down e inmunoprecipitación por afinidad. Así mismo, se hicieron pruebas de microscopía de fluorescencia para visualizar la localización de P-Rex1 y la subunidad reguladora PRKAR1a. Para ello se utilizaron plásmidos con cDNAs que codifican para las proteínas de interés unidos a fluoróforos como EGFP y mCherry. Esto permitió evaluar la dinámica de ambas proteínas dentro de la célula y correlacionar con un evento funcional la asociación de P-Rex1 con PRKAR1a, que se vería reforzada en células COS-7 estimuladas con SDF-1, resultados apoyados por cursos temporales hechos en células HEK293T transfectadas con ambas proteínas y estimuladas con SDF-1.

II. Importancia de la interacción de P-Rex1 con PRKAR1a en procesos de migración celular polarizada: Para evaluar la participación de PRKAR1a en migración celular y sus efectos sobre P-Rex1 en eventos de migración celular se incluyeron experimentos de cierre de herida y migración celular polarizada en cámara de Boyden. Se hizo uso del knock down de la subunidad reguladora de PKA (shRNA-PRKAR1a) o bien sobreexpresando a la subunidad reguladora PRKAR1a unida a mCherry y/o P-Rex1 marcado con EGFP.

Se prepararon varias herramientas moleculares durante el desarrollo del presente proyecto. Entre ellas se encuentran plásmidos con diferentes secuencias de DNA que fueron utilizados para algunos de los experimentos de este trabajo. La preparación involucró el empleo de diferentes protocolos como transformación de bacterias, digestiones enzimáticas, PCR (Polymerase Chain Reaction), ligaciones, purificaciones y clonaciones entre otras, que a continuación se describen detalladamente.

6.1 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS.

Este protocolo se utiliza para introducir un determinado de DNA plasmídico en las bacterias y posteriormente obtener ese plásmido y amplificarlo.

- Descongelar en hielo las bacterias competentes a transformar.
- Adicionar 1µl del plásmido a introducir en las bacterias competentes e incubar en hielo durante 20-30 minutos.
- Provocar un choque térmico colocando las bacterias con el cDNA a 42°C durante 1 minuto e inmediatamente después incubar en hielo por 2 minutos.
- Agregar a las bacterias 500µl de medio LB (o 300µl de medio SOC en el caso de transformación de bacterias con cDNA producto de ligación).
- Incubar a 37°C en agitación (180-200 rpm) durante 1 hora.

- Centrifugar a 2,000rpm/1 minuto
- Eliminar sobrenadante y resuspender las bacterias con 100µl de medio LB o Super Broth adicionado con el antibiótico correspondiente (ampicilina, kanamicina, etc. según la resistencia del vector que se trate).
- Plaquear toda la suspensión celular para el caso de un plásmido producto de ligación o sólo 5-10µl sobre placas con agar conteniendo el antibiótico de resistencia correspondiente.
- Incubar a 37°C por 12-16 horas y después continuar con la amplificación de las bacterias.
- Amplificación de las bacterias transformadas: picar una de las colonias desarrolladas en las placas de agar e inocular 1 ml de medio LB o Super Broth conteniendo el antibiótico de resistencia correspondiente. Incubar a 37°C a 180-200rpm por 16 horas.
- Aislar el DNA plasmídico.

6.2 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO.

Partir de las bacterias transformadas y amplificadas.

A continuación se describen dos protocolos de aislamiento de DNA plasmídico utilizados y realizados a temperatura ambiente.

6.2.1 Protocolo A: GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma).

- Centrifugar las bacterias 13,000rpm/1 minuto. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender las bacterias en 200µl de *Solución de Resuspensión* previamente suplementada con *Solución de RNase A*.
- Adicionar 200µl de la *Solución de lisis* y mezclar gentilmente. Mantener a temperatura ambiente por 5 minutos.

- Adicionar 350µl de la *Solución de Neutralización*. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 13,000rpm/10 minutos y obtener el sobrenadante (lisados celulares).
- Para preparar la *Columna de Sílica*: hacer pasar a través de la columna 500µl de *Solución de Preparación de Columna* centrifugándola por 1 minuto a 13,000rpm, eliminar la solución. Ya preparada la *Columna*, colocar dentro de ella los lisados celulares obtenidos en el punto anterior y centrifugar nuevamente a 13,000 rpm/1 minuto. Eliminar el filtrado.
- Lavar la columna con 750µl de la *Solución de Lavado* (previamente adicionada con etanol). Centrifugar a 13,000 rpm/1 minuto y eliminar el filtrado.
- Secar la columna centrifugando una vez más.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección y añadir de 50-100µl de la *Solución de Elución* o agua PiSA para eluir y obtener el DNA.

6.2.2 Protocolo B.

- Mediante centrifugación (13,000rpm) de las bacterias transformadas obtener el pellet y resuspender con *Solución de Reuspensión*. Vortexear.
- Adicionar 330 de *Solución de Neutralización*. Mezclar.
- Adicionar 40µl de Cloroformo y vortexear durante 1 minuto.
- Centrifugar a 13,000 rpm durante 2 minutos.
- Colectar el sobrenadante y adicionar 1 ml de Isopropanol. Vortexear.
- Centrifugar a 13,000rpm por 15 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- Lavar el pellet adicionando Etanol al 70% sin resuspender y después quitar el etanol .
- Adicionar nuevamente un poco más de Etanol al 70% y resuspender.
- Centrifugar a 13,000rpm durante 5 minutos. Remover por completo el sobrenadante.

- Secar al aire por 15 minutos.
- Resuspender el pellet con 30µl de agua destilada.

Nota: La Solución de Resuspensión y Neutralización utilizados en el protocolo B son las mismos que las usadas en el protocolo A.

6.3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.

6.3.1 Protocolo A: *GenClean* (Q-BIOgene).

- Cortar del gel de agarosa la banda correspondiente al DNA de interés a purificar y colocarla en un tubo eppendorf.
- Pesar la banda cortada y determinar el volumen aproximado del gel (100g \approx 100µl).
- Adicionar 3 volúmenes de *NaI* y colocar el tubo eppendorf en un baño de agua a 45-55°C hasta disolver la agarosa. Mezclar cada 2 minutos.
- Resuspender mediante vortex por 1 minuto la suspensión de sílica *GlassMilk* y adicionar 5µl.
- Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la unión del DNA a la sílica. Mezclar cada 1-2 minutos para mantener la suspensión.
- Centrifugar por 10 segundos a 13,000 rpm. Eliminar sobrenadante.
- Lavar el pellet con 700µl de solución *New Wash* (previamente reconstituido con agua destilada y etanol como lo marca su catálogo, Cat#1001-200). Resuspender el pellet con micropipeta y centrifugar por 10 segundos a 13,000 rpm y eliminar el sobrenadante. Hacer dos lavados más y en el último lavado después de eliminar el sobrenadante, volver a centrifugar para eliminar lo más posible los restos de sobrenadante.
- Secar el pellet. Dejar la tapa del tubo eppendorf abierta por 5-10 minutos a temperatura ambiente para eliminar cualquier residuo de etanol.

- Eluir el DNA del GlassMilk: Adicionar 20-50µl de agua deionizada y resuspender el pellet. Centrifugar por 30 segundos a 13,000 rpm y pasar cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo eppendorf, que es el que contiene al DNA ya purificado.

6.3.2 Protocolo B: QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN).

Método para purificar fragmentos de DNA de cadena sencilla o doble que son producto de PCR o reacciones enzimáticas.

- Adicionar 10 volúmenes de *Buffer PN* a 1 volumen del producto de PCR y mezclar.
- Colocar la columna *QIAquick spin* en un tubo de colección.
- Aplicar la muestra a la columna para capturar el DNA. Centrifugar a 6,000rpm/1 minuto y eliminar el líquido filtrado.
- Lavar la columna con 750µl de *Buffer PE* y centrifugar a 6,000rpm/1 minuto. Eliminar el filtrado.
- Centrifugar nuevamente la columna a 13,000rpm/1 minuto para eliminar etanol residual del *Buffer PE*.
- Colocar la columna en un nuevo tubo eppendorf.
- Eluir el DNA: adicionar 100-200µl de agua deionizada en el centro de la columna, esperar 1 minuto y centrifugar a 13,000rpm/1 minuto.

Nota: Al *Buffer PE* se le debe adicionar previamente a su uso etanol al 100%.

6.3.3 Protocolo C: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Método para extraer y purificar DNA de geles de agarosa (de bajo punto de fusión).

- Cortar del gel de agarosa (con una navaja limpia) el fragmento de DNA.
- Colocar en un tubo la rebanada de gel y pesarla. Adicionar 3 volúmenes de *Buffer QG* a 1 volumen de gel.

- Incubar a 50°C por 10 minutos o hasta que el gel se disuelva completamente. Vortexear el tubo cada 2-3 minutos.
- Si el DNA a extraer y purificar es <500 pb o >4 kb adicionar 1 volumen (del gel) de isopropanol para incrementar el rendimiento.
- Colocar la *columna QIAquick spin* en un tubo de colección.
- Para capturar el DNA de la muestra, colocarla en la columna y centrifugar por 1 minuto. Eliminar el líquido filtrado.
- Adicionar 0.5 ml de *Buffer QG* a la columna y centrifugar por 1 minuto para remover trazas de agarosa.
- Lavar la columna adicionando 0.75 ml de *Buffer PE*. Centrifugar por 1 minuto y eliminar el filtrado.
- Centrifugar nuevamente la muestra para eliminar el etanol residual del *Buffer PE*. Eliminar el filtrado.
- Colocar la columna en un nuevo tubo.
- Eluir el DNA: poner en el centro de la columna 30-50µl de agua deionizada, esperar 1 minuto y centrifugar 1 minuto.

Nota: El *Buffer PE* debe ser adicionado previamente con etanol al 100%. Todas las centrifugaciones de este protocolo se realizan a 13,000rpm.

6.3.4 Protocolo D: QIAEX II Agarosa Gel Extraction (QIAGEN).

Este fue un segundo protocolo utilizado para purificar DNA a partir de geles de agarosa, ahora utilizando *esferas QIAEX II*.

- Cortar del gel de agarosa la banda correspondiente al DNA de interés a purificar y colocarla en un tubo eppendorf.
- Pesar la rebanada de gel y adicionar 3 volúmenes del *Buffer QX1* a 1 volumen de gel.

- Resuspender las *esferas QIAEX II* vortexeando por 30 segundos. Adicionar 10µl de esferas a la muestra.
- Incubar a 50°C por 10 minutos para solubilizar la agarosa y capturar el DNA con las esferas. Vortexear cada 2 minutos.
- Centrifugar la muestra durante 1 minuto y remover cuidadosamente el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 500µl de *Buffer QXI* y vortexear. Centrifugar por 1 minuto y eliminar el sobrenadante.
- Lavar dos veces más el pellet con 500µl Buffer PE para remover contaminantes residuales de sales. Centrifugar por 1 minuto y eliminar sobrenadante.
- Secar al aire el pellet por 10-15 minutos o hasta que el pellet se vuelva blanco.
- Eluir el DNA adicionando 20µl de agua deionizada y vortexear. Mantener a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Centrifugar durante 1 minuto y coleccionar el sobrenadante en un nuevo tubo.

Nota: se debe adicionar etanol al 100% al *Buffer PE* previo a su uso, como se indica en el catálogo del kit. Todas las centrifugaciones de este protocolo se realizan a 13,000rpm.

6.4 MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES.

Se utilizaron las líneas celulares HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293 Transformed cells*) y COS-7 (*CV-1 (simian) cells in Origin, carrying the SV40 genetic material*) que se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, a temperatura de 37°C y 5% CO₂. Las células HUVEC fueron utilizadas por debajo o hasta el pasaje 8 y mantenidas con medio HuMedia-EG2 (kurabo).

6.5 TRANSFECCIÓN CELULAR.

Se transfectaron las células HEK293T y COS-7 con Lipofectamine y Plus Reagent de acuerdo al protocolo de transfección de Invitrogen. 48h posterior a su transfección, 72h en el caso de transfección de shRNA, se procesaron los cultivos celulares.

6.5.1 Protocolo de transfección en placas P100: (para P35, ver Tabla 5).

- Utilizar medio DMEM libre de SFB y antibióticos (DMEM p/t)
- En un tubo colocar 750µl de medio DMEM p/t, adicionar 4µg del DNA a transfectar y 10µl de reactivo Plus. Agitar e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos (mezcla A).

Nota: para el caso de células sembradas en placas P35 la cantidad de DNA total a transfectar se sugiere sea 1µg, aunque estas cantidades dependen del tipo celular, el nivel de expresión del DNA, etc.

- En paralelo preparar en un segundo tubo (mezcla B) los liposomas (Lipofectamina) en 750µl de DMEM p/t, incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Mezclar A con B e incubar nuevamente por 15 minutos a temperatura ambiente. Mientras transcurre la incubación, preparar las células a transfectar, que al momento deberán estar en una confluencia de 60-80% dependiendo del tipo celular y el experimento en cuestión. Lavar las células con 2 ml PBS 1X y luego eliminar el PBS de lavado. Adicionar 5 ml de DMEM p/t (para P35 adicionar 800µl).
- Agregar la mezcla A/B a la caja de células a transfectar e incubar a 37°C por 3-5 horas.

Nota: en el caso de las células COS-7 que fueron utilizadas en experimentos para visualizar la localización de proteínas y analizar los efectos de estímulos sobre la proteínas de interés, las células se dejaron con los liposomas sólo por 3 horas para mantenerlas saludables y así evitar que éstas se maltrataran durante el curso del experimento.

- Recuperar las células. Transcurrido el tiempo de incubación con los liposomas, quitar el DMEM y agregar medio fresco DMEM ahora con SFB al 10% suficiente para mantener el cultivo.

A continuación se muestra la tabla que indica las cantidades de reactivo a utilizar en la transfección de células sembradas en placas P35:

Placas P35	
Plus:	3µl
Lipofectamina:	3µl
DMEM p/t:	100µl

Tabla 5. Reactivos para transfección en cajas p35.

6.6 PULL DOWN E INMUNOPRECIPITACIÓN.

Se hicieron experimentos de purificación por afinidad para detectar asociaciones entre proteínas de interés, precipitando a una en específico mediante esferas de glutatión sefarosa o proteína G dependiendo de la técnica a seguir y detectando mediante el uso de anticuerpos a la proteína que se sospecha se asocia a la precipitada por afinidad. Para el caso de los experimentos que involucraban estímulos, las células se ayunaron por 16 horas con DMEM libre de SFB. Previo a los ensayos, las células se lavaron con PBS 1X y se cosecharon para obtener después los lisados celulares utilizando buffer de lisis conteniendo Tris 50mM pH 7.5, NaCl 0.15 M, EDTA 5mM, triton X-100 al 1% con los inhibidores de proteasas leupeptina 10µg/ml, aprotinina 10µg/ml y fenil metil sulfonil fluoruro 1mM (Sigma). Estos protocolos se siguieron trabajando sobre hielo, utilizando el buffer de lisis frío. Los lisados celulares se centrifugaron a 13,000rpm/10min/4°C y del sobrenadante se tomó una parte de muestra (25µl de un total de 1000µl) como lisados totales (LT), mientras que el resto del sobrenadante se destinó para los ensayos de pull down (PD) o inmunoprecipitación (IP), protocolos que se muestran a continuación.

6.6.1 Pull down.

- Agregar 25 μ l de perlas glutatión sefarosa (GE Healthcare) al sobrenadante de las muestras destinadas a pull down.
- Agitar la muestras, ya conteniendo las perlas, en el rocker por 30 minutos, sobre hielo.
- Centrifugar las muestras 13,000rpm/1 min/4°C.
- Eliminar el sobrenadante cuidando mantener las perlas de glutatión sefarosa.
- Hacer tres lavados a las perlas con buffer de lisis, agregando 1 ml de buffer, vortexeando por 2-3 segundos, centrifugando las muestras min/5,000rpm/4°C y eliminando nuevamente el sobrenadante.
- Resuspender la pastilla en buffer de muestra 1X con mercaptoetanol.
- Hervir por 5 minutos las muestras.

6.6.2 Inmunoprecipitación.

- Agregar a las muestras destinadas a inmunoprecipitación 1 μ l del anticuerpo para la proteína de interés (ejemplo: anti HA, anti Flag).
- Incubar las muestras a 4°C en el rocker durante toda la noche (16 h).
- Agregar a las muestras 35 μ l de las perlas de proteína G agarosa (Millipore) e incubar en el rocker a 4°C/3h.
- Centrifugar a 5,000rpm/1 min/4°C y eliminar el sobrenadante evitando perder las perlas.
- Hacer 3 lavados de las perlas con buffer de lisis, agregando 1 ml de buffer, vortexeando por 2-3 segundos, centrifugando las muestras min/5,000rpm/4°C y eliminando nuevamente el sobrenadante.
- Resuspender la pastilla en buffer de muestra 1X con mercaptoetanol.

- Hervir por 5 minutos las muestras.

Para las muestras correspondientes a los lisados totales, adicionar buffer de muestra 4X y hervir por 5 minutos.

6.7 INMUNOBLLOT.

Las muestras de lisados totales, pull down e inmunoprecipitaciones se resolvieron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en buffer de corrida desnaturizante (Tris base, glicina y SDS) a 30-50 mA y se transfirieron las proteínas a membrana inmobilizada (Millipore) a 320 mA/2.5h. Después se dio el siguiente tratamiento a las membranas:

- Bloquear la membrana con leche al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente incubándola en el rocker.
- Hacer 3 lavados cada uno de 5 minutos con TBS-tween al 0.05% para eliminar el exceso de leche.
- Incubar la membrana con los anticuerpos respectivos dependiendo de la proteína de interés a detectar. La dilución del anticuerpo se hizo en TBS-tween al 0.05%.

Los anticuerpos utilizados fueron: HA (Covance), Flag y P-Rex1 (Cat No. HPA001927, Sigma), anti-PKA[R1] (Cat No. 610165) y Rac1 (BD Transduction Laboratories), GST B-14, GFP B-2 y ERK 2 C-14 (Santa Cruz Biotechnology), phospho-p42/44 Map Kinase T202/Y204 (Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: goat anti-mouse monoclonal (Invitrogen, laboratorios zymed y KPL) y goat anti-rabbit (Rockland Immunochemicals for research y KPL).

6.8 FIJACIÓN CELULAR Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Para los experimentos en donde se buscaron efectos de determinados estímulos en células previamente ayunadas, las células se fijaron con paraformaldehído de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Eliminar el medio de las células a fijar.
- Cubrir por completo la superficie en donde se encuentran las células a fijar con paraformaldehído al 4% en PBS.
- Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Eliminar paraformaldehído y lavar las células 2 veces con PBS 1X (no es necesario que el PBS sea estéril).
- Adicionar PBS suficiente a las células fijadas para mantenerlas hidratadas y en buenas condiciones.
- Visualizar en el microscopio y capturar las imágenes de interés.

Nota: las células fijadas se pueden mantener en buenas condiciones durante 2-4 días si se guardan con PBS a una temperatura de 4°C.

6.9 CIERRE DE HERIDA.

- Preparar placas p35 o placas de 6 pozos: recubrir el fondo de la caja con gelatina al 0.02% e incubar durante 30 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo retirar la gelatina.
- Sembrar las células a alta densidad con el objetivo de alcanzar el máximo de confluencia transcurrido un día.
- Ayunar durante 16 horas y a 37°C las células con DMEM libre de SFB y antibióticos. Antes de que finalice el ayuno (2 horas antes) incubar las células con mitomicina C a una concentración final de 12 μ M a 37°C.
- Retirar la mitomicina C y lavar las células con PBS 1X. Proceder a hacer la herida en la monocapa de células utilizando la punta de una micropipeta de 10 μ l y posteriormente hacer dos lavados más con PBS 1X a las células con la finalidad de dejar la herida limpia de residuos celulares.

- Adicionar medio fresco con los respectivos estímulos de acuerdo a las condiciones a evaluar.
- Determinar la duración del experimento dependiendo de la línea celular a utilizar (generalmente entre 24-36 horas) y los tiempos a evaluar del cierre de herida para así tener referencias del avance celular en cada condición. Tomar fotografías en el microscopio a lo largo de la herida.

Las imágenes celulares obtenidas en los experimentos de fluorescencia y cierre de herida fueron tomadas con el microscopio invertido y de fluorescencia Nikon Eclipse Ti (con el lente de inmersión en aceite Plan Apo VC 1.4 en el caso de las fluorescencias y el lente Plan Fluor 10X para el cierre de herida) utilizando una cámara digital Nikon DS-Qi1Mc.

6.10 MIGRACIÓN CELULAR.

Para evaluar la quimiotaxis celular se partió de placas P100 con células previamente transfectadas con los plásmidos indicados para cada experimento y se utilizaron Cámaras de Boyden modificadas de 48 pozos. En estos experimentos de migración se siguieron los procedimientos que se muestran a continuación:

6.10.1 Preparación de filtros de policarbonato.

- Los filtros a utilizar deben ser libres de polivinilpirrolidona y se recubren con proteínas de matriz extracelular. Para los experimentos desarrollados en este trabajo los filtros se recubrieron con gelatina estéril al 2%.
- El filtro se recubre con gelatina por ambos lados y se coloca a 37°C (incubar 1 hora por cada lado).
- Transcurrido el tiempo de recubrimiento, escurrir y dejar secar el filtro a temperatura ambiente evitando doblarlo o maltratarlo.

6.10.2 Cosecha de células.

- Lavar las células con PBS 1X y despegarlas con 1 ml Tripsina/EDTA (Sigma).
- Una vez despegadas las células, adicionar 5 ml de DMEM libre de SFB y antibióticos.
- Recolectar las células en tubos falcon de 15 ml y centrifugar a 1,000rpm/3 minutos a temperatura ambiente.
- Eliminar el medio sobrenadante y adicionar 3 ml de DMEM libre de SFB y antibióticos suplementado con BSA al 0.1%.
- Resuspender perfectamente las células y proceder a su cuantificación.

6.10.3 Cuantificación de células.

- De la suspensión de células obtenidas, hacer una dilución específica para el conteo celular. Resuspender bien la dilución celular, tomar 10 µl de la suspensión y colocarlos en el hemocitómetro.

Nota: para las células COS-7 se aplicó una dilución 1:5 (factor de dilución 5).

- Hacer un conteo por duplicado de cada muestra celular. Contar las células que se encuentran en los cuatro cuadrantes del hemocitómetro. Al final, obtener el promedio para aplicar la siguiente fórmula y calcular las células por mililitro.
- $\text{Células/ml} = (\text{Número de células promedio}) \times (\text{factor de dilución}) (\text{factor de conversión hemocitómetro: } 1 \times 10^4)$

6.10.4 Ensayo de migración.

La cámara de boyden modificada cuenta con dos compartimentos separados por un filtro de policarbonato y un empaque de silicón, como se muestra en la siguiente imagen.

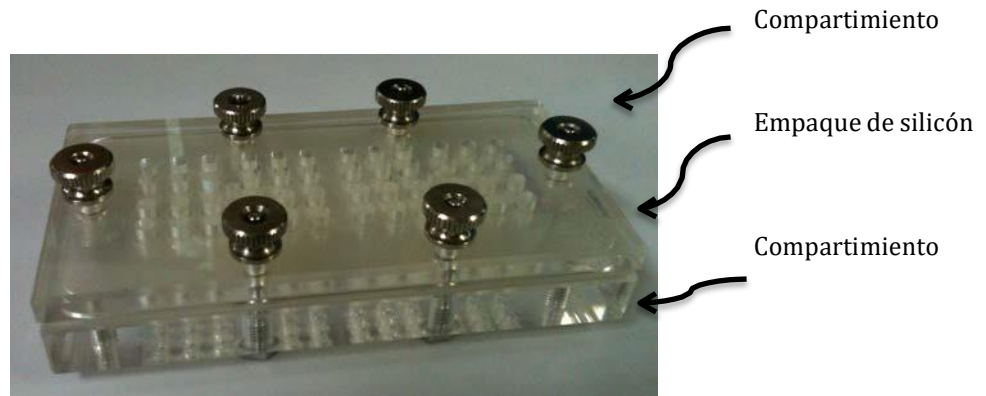


Figura 18. Cámara de Boyden.

En el compartimento inferior de la cámara se colocan los estímulos a evaluar en sus respectivos pozos, mientras que en los pozos del compartimento superior se colocan las células que se van a someter a prueba de quimiotaxis. Cada pozo de la cámara de 48 pozos debe ser llenado con un volumen máximo de 30 μ l para el estímulo y un volumen de 50 μ l para colocar las células a evaluar.

Para montar el experimento, seguir los siguientes puntos:

- Preparar los estímulos a utilizar de acuerdo a las condiciones establecidas.
- Colocar el compartimento de la parte inferior de la cámara en una superficie plana, asegurando que la marca NP de la cámara se encuentre en la parte superior izquierda.
- Llenar cada uno de los pozos inferiores de la cámara con 30 μ l de los diferentes estímulos a probar. Un ligero menisco positivo deberá formarse cuando el pozo esté lleno, previniendo la formación de burbujas una vez que el filtro sea colocado sobre este compartimento.
- Con ayuda de pinzas, colocar el filtro de policarbonato (ya recubierto con la proteína de matriz extracelular) sobre los estímulos ya distribuidos en el compartimento inferior de la cámara de boyden. Previo a ello, se recomienda hacer una pequeña muesca (un corte) en una de las esquinas del filtro y hacerla coincidir con la parte superior izquierda (con la marca NP) del compartimento en donde se colocan los estímulos,

para ubicar al final del experimento, la orientación en que fueron cargados tanto los estímulos, como las células.

- Sobre el filtro, a su vez colocado ya sobre el compartimento inferior, colocar el empaque de silicón. Finalmente, la parte superior de la cámara se coloca sobre el empaque de silicón, haciendo coincidir, también en este caso, la marca NP de la cámara.
- Fijar ambos compartimentos de la cámara con los tornillos.
- Colocar las células en los pozos del compartimento superior de la cámara. Deben estar a una concentración de 50,000 células/pozo en un volumen de 50µl. Para ello deberá haberse ajustado la cantidad de células a partir de la suspensión obtenida en el último punto del procedimiento B (cosecha de células).
- Incubar la cámara en un ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO₂ y dejar correr el experimento por 5 horas (para el caso específico de las células COS-7).

6.10.5 Remoción, lavado y tinción del filtro.

- Remover los tornillos que mantienen sujetos los compartimentos de la cámara de boyden.
- Separar el compartimento en donde se colocaron las células y retirar cuidadosamente el filtro de policarbonato manteniendo siempre hacia arriba (para los siguientes procedimientos) el lado del filtro al que migraron las células, en caso de haber migrado.
- Fijar las células que migraron y que se encuentran en el filtro. Cubrir el filtro con metanol absoluto durante 5 minutos y transcurrido este tiempo, dejar secar el filtro por capilaridad.
- Teñir las células que se encuentran en el filtro. Sumergir el filtro en solución de cristal violeta (0.1% cristal violeta, 20% metanol) y dejar reposar por 10 minutos.
- Lavar el filtro con PBS 1X para retirar el exceso de cristal violeta.

- Colocar el filtro sobre un portaobjetos con el lado de las células que migraron hacia abajo y limpiar cuidadosamente con un algodón húmedo el lado del filtro de las células que no migraron.
- Capturar la imagen del resultado final del ensayo de migración (portaobjetos con el filtro y las células que migraron) y cuantificar las células que migraron mediante ImageJ y analizar los resultados.

Aquí concluye el experimento de quimiotaxis en cámara de Boyden en donde finalmente se obtiene la evidencia de células que logran migrar o no a través del filtro de policarbonato por el efecto de determinado estímulo.

En la siguiente parte del escrito se describe a detalle la forma en que se hicieron algunas clonaciones, diseño de oligos y construcción de plásmidos de interés para el laboratorio y para el presente trabajo.

6.11 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.

Se planeó clonar a mCherry en el vector pCEFL2 con el objetivo de tener este plásmido como una de las herramientas a utilizar a futuro y poder introducir en él diferentes DNA de interés con la posibilidad de dar seguimiento a las proteínas expresadas en este plásmido a través de microscopía de fluorescencia.

6.11.1 mCherry:

Se diseñaron los primers en dirección 5' y 3' para obtener a mCherry por PCR y clonarla en el vector pCEFL2, los primers incluyeron los sitios de reconocimiento para la enzima BglII flanqueando a la secuencia que codificaría para mCherry; se solicitó la síntesis de los siguientes oligos a la compañía de Sigma Aldrich.

>5'BglII ATAagatctATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG

>3'BglII ATAagatctCTTG TACAGCTCGTCCATGCC

Quality Assurance Document													
Customer: SIGMA-ALDRICH QUIMICA, SA DE CV YIO BEATRIZ SANCHEZ Customer No. 00000017700049683749										Sales Order No. 3003649148 P.O. No. 4501106754 Shipment Date			
Oligo Name	Oligo #	LEN	Pur	Scale	MW	Tm	µg/OD	OD	µg	nmol	% GC	Zndary	Dimer Sequence (5-3)
mCherry-5' BglI	300364914-010	30	DST	0.25	9426.0	71.7	25.9	15.3	455.2	48.4	50.8%	None	No ATAGATCTATGCTGACCAAGCCGCGAGGAG
mCherry-3' BglI	300364914-020	30	DST	0.25	9116.7	71.7	32.4	13.2	435.1	45.7	45.6%	Very weak	No ATAGATCTCTTGTACAGCTGCTGCTGATGCC

Figura 19. Oligos para pCEFL2-mCherry.

Los primers se reconstituyeron con agua deionizada preparando un stock con concentración [100µmol]:

mCherry-5' BglII: agregar 484µl de agua deionizada

mCherry-3' BglII : agregar 467µl de agua deionizada

A partir del stock preparar alícuotas de trabajo a una concentración 10µmol.

Agua deionizada	38.43µl
Buffer <i>Expand High Fidelity</i> 10X	5.0µl
Templado mCherry-C1 (0.440λ)	0.07µl
Primer 5' mCherry-BglII(10µM)	1.0µl
Primer 3' mCherry-BglII (10µM)	1.0µl
DMSO	1.5µl
Betaína	1.5µl
dNTP's	1.0µl
<i>Taq Polimerasa</i>	0.5µl
Volumen total de la reacción	50.0µl

Tabla 6. Amplificación de mCherry por PCR (Sistema High Fidelity).

Las temperaturas de la PCR fueron las siguientes:

Desnaturalización:	94°C / 5 min	
Alineación:	94°C / 30 seg	} (35 ciclos)
	68°C / 1 min	
	72°C / 1 min	
Elongación:	72°C / 7 min	

Tabla 7. Temperatura de PCR para amplificación de mCherry.

Se preparó un gel de agarosa al 1% para analizar el producto de PCR obtenido, esperando un fragmento de 708 pb correspondiente a mCherry. Su correcta amplificación se muestra en la Figura 20, en donde se ve una banda por arriba de 700 pares de bases. Después se purificó el producto de PCR eluyendo finalmente el DNA con 50µl de Buffer EB (ver Purificación de DNA, Protocolo B: *QIAquick PCR purification*).

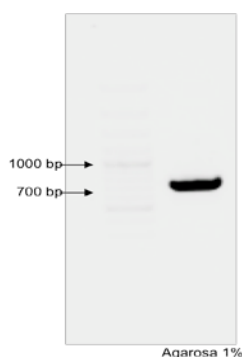


Figura 20. Fragmento correspondiente a mCherry.

Posteriormente, se digirió tanto el producto de PCR (mCherry) como el vector pCEFL2 (en el cual se insertaría el fragmento) con la enzima de restricción BglII para hacer accesibles los sitios de unión en ambos fragmentos.

Reacciones de digestión:

<u>mCherry:</u>	45.0µl	<u>pCEFL2:</u>	1.0µl
Buffer M (Roche):	5.0µl	Buffer M (Roche):	2.0µl
BglII:	2.0µl	BglII:	0.5µl
Volumen total:	52.0µl	Agua deionizada:	16.5µl
		Volumen total:	20.0µl

Tabla 8. Reacciones de digestión para la preparación de la clonación de mCherry en pCEFL2.

- Incubar las digestiones a 37°C durante toda la noche.

Los productos de digestión fueron analizados en gel de agarosa al 1% esperando ver la banda aproximada a 700pb de mCherry y otra de 6,000pb correspondiente al vector pCEFL2 linearizado como se confirma en la siguiente imagen:

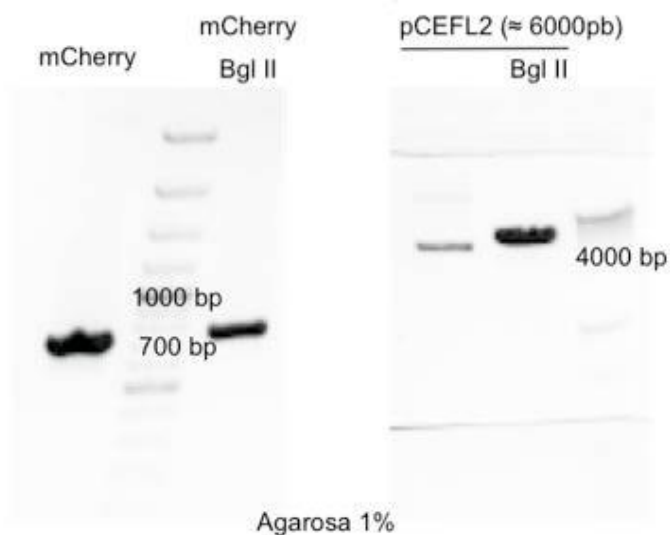


Figura 21. Restricción con Bgl II de vector e inserto.

y una vez revisados los resultados anteriores, se purificaron ambos productos mediante el protocolo C de purificación de DNA: *QIAquick Gel Extraction Kit*. A continuación se muestra

el gel preparativo para la purificación del DNA, así como los productos finales de la purificación:

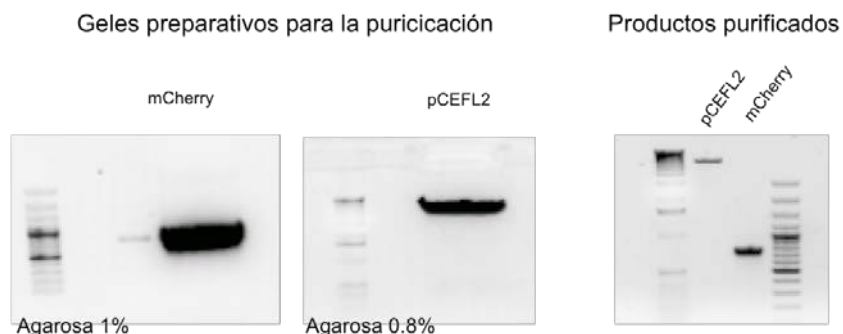


Figura 22. Preparación y purificación de los fragmentos pCEFL2 y mCherry.

Se ligaron los fragmentos mCherry y pCEFL2 incubando la reacción a 16°C durante toda la noche:

Agua deionizada:	11.5 μ l
Buffer T4 10X:	2.0 μ l
Ligasa (Roche):	0.5 μ l
pCEFL2:	1.0 μ l
mCherry:	5.0 μ l
<hr/>	
Volumen total:	20.0 μ l
<hr/>	

Tabla 9. Reacción de ligación pCEFL2 / mCherry.

Se transformaron bacterias ultracompetentes *E.coli* DH5 α con 5 μ l del producto de ligación. Estas bacterias transformadas fueron plaqueadas y amplificadas en medio sólido con ampicilina. Posteriormente se extrajo el DNA de algunas de las colonias desarrolladas (ver protocolo de Transformación de bacterias y Aislamiento de DNA, protocolo A).

Para verificar que el fragmento de mCherry fue ligado al vector pCEFL2 se realizó la

digestión diagnóstica del DNA obtenido utilizando la enzima de restricción BglII. Las muestras se analizaron en gel de agarosa y se observó que en las clonas 1 y 4 efectivamente se había incorporado el fragmento de mCherry en el vector pCEFL2. Además, se verificó la expresión de estas construcciones en células 293T transfectadas con el nuevo vector pCEFL2-mCherry. Las células transfectadas fueron analizadas 24 horas después de su transfección, se observaron con microscopio de fluorescencia, visualizando células en rojo confirmando así la clonación de mCherry en pCEFL2, figura siguiente.

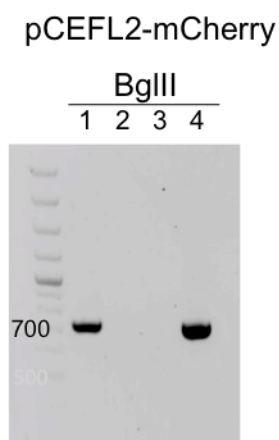


Figura 23. Clonas positivas para pCEFL2-m Cherry (1 y 4).

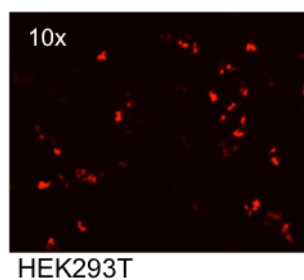


Figura 24. Células HEK293T transfectadas con pCEFL2-mCherry.

Otro plásmido preparado fue pEGFP-C1-P-Rex1:

6.11.2 pEGFP-C1-P-Rex1:

Se subclonó el GEF P-Rex1 proveniente del plásmido pCEFL-EGFP-P-Rex1 en el vector pEGFP-C1 con la finalidad de tener una mejor expresión del GEF P-Rex1 en verde y poder visualizarlo por fluorescencia con mayor facilidad.

Plan:

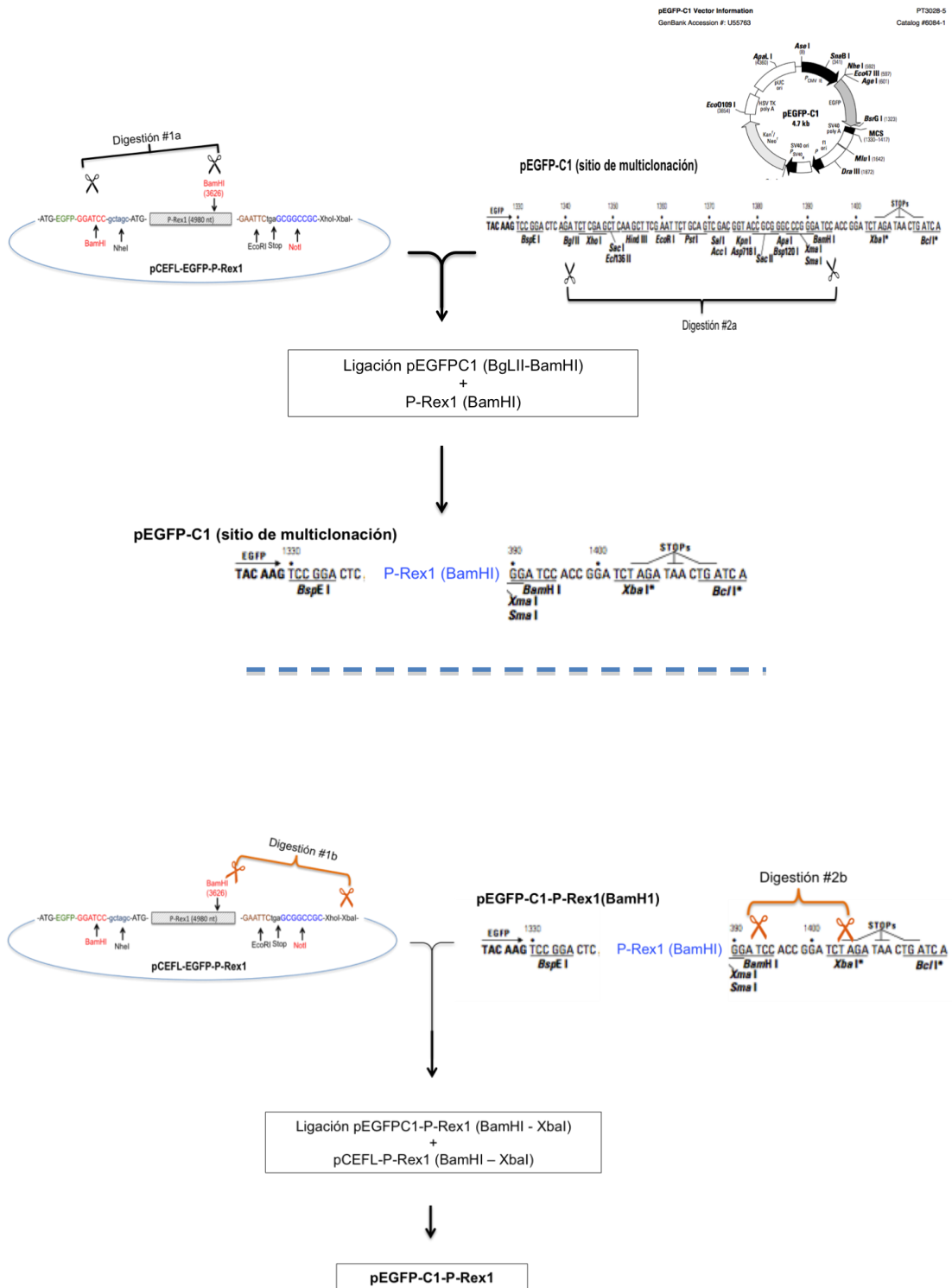


Figura 25. Plan de subclonación de P-Rex1 en el vector pEGFP-C1.

6.11.3 Procedimiento de la clonación:

- I. Digerir el vector pCEFL-EGFP-P-Rex1 con la enzima de restricción BamHI para extraer el fragmento que corresponde a la primera parte de P-Rex1 aproximado a 3630pb. En paralelo, linearizar el vector pEGFP-C1 digiriendo con BglII y BamHI, enzimas de restricción que dejan terminaciones cohesivas compatibles entre sí.

Reacciones de digestión:

<u>pCEFL-EGFP-P-Rex1</u> (1λ):	3.0μl	<u>pEGFP-C1</u> (1λ):	1.0μl
Buffer K (TakaRa):	2.0μl	Buffer K (TakaRa):	2.0μl
BamHI (TakaRa):	1.0μl	BamHI (TakaRa):	1.0μl
Agua deionizada:	14.0μl	BglII (TakaRa):	1.0μl
Total:	20.0μl	Agua deionizada:	15.0μl
		Total:	20.0μl

Tabla 10. Restricción de pCEFL-EGFP-P-Rex1 y pEGFP-C1.

- Incubar las digestiones a 37°C por 4 horas.
- Dar un tratamiento con fosfatasas al vector pEGFP-C1 linearizado para evitar su recircularización.
- Agregar 1μl de TSAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Promega) al tubo eppendorf de pEGFP-C1 linearizado e incubar 15 minutos a 37°C.
- Verificar mediante gel de agarosa al 1% (100v/20 min) los fragmentos obtenidos y si corresponden a los esperados, purificarlos siguiendo el protocolo de Purificación de DNA, protocolo D (*QIAEX II Agarosa Gel Extraction*). Para el caso de pCEFL-EGFP-P-Rex1, el fragmento a purificar es el de menor peso que corresponde a ≈3630pb.

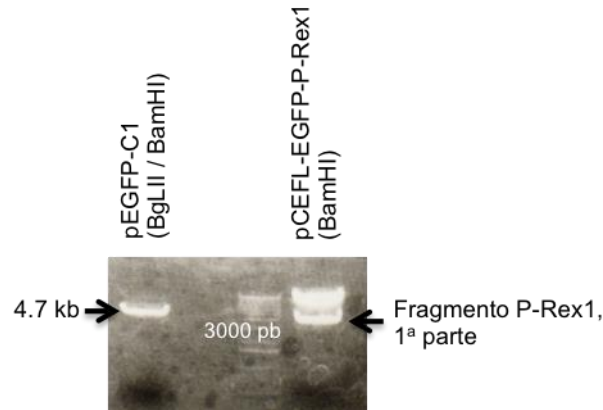


Figura 26. Gel diagnóstico para verificar la linealización del vector pEGFP-C1 y la liberación de fragmentos de P-Rex1.

- Ligar el fragmento correspondiente al GEF P-Rex1 en el vector pEGFP-C1.

Reacción de ligación:

pEGFP-C1:	0.2 μ l
P-Rex1(fragmento 1ª parte):	2.3 μ l
Ligation High Enzyme:	2.5 μ l
Volumen Total:	5.0 μ l

Tabla 11. Reacción de ligación de pEGFP-C1 con fragmento 1 de P-Rex1.

- Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
- Transformar bacterias ultracompetentes DH5 α y obtener su DNA (Ver Transformación de bacterias y Aislamiento de DNA protocolo B). Aquí se desarrollaron varias colonias de bacterias de las que se evaluaron 4 de ellas.
- Verificar la inserción de P-Rex1 en el vector pEGFP-C1 (pEGFP-C1+fragmento_1ª_parte_P-Rex1): digerir el DNA obtenido de las 4 clonas con las enzimas NotI (sitio de reconocimiento en P-Rex1 en el nucleótido 113) y BamHI para obtener un fragmento de 3,513pb en caso de que el fragmento de P-Rex1 (primera

parte) haya sido ligado a pEGFP-C1.

Digestión:

pEGFP-C1+fragmento_1ª_parte_P-Rex1:	3.0µl
BamHI (TakaRa):	0.5µl
NotI (TakaRa):	0.5µl
NEBuffer 3:	2.0µl
BSA 10X:	2.0µl
Agua deionizada:	12.0µl
<hr/>	
Volumen total:	20.0µl

Tabla 12. Reacción de digestión para diagnóstico de la inserción del fragmento_1ª parte_P-Rex1 en pEGFP-C1.

- Incubar a 37°C durante toda la noche.

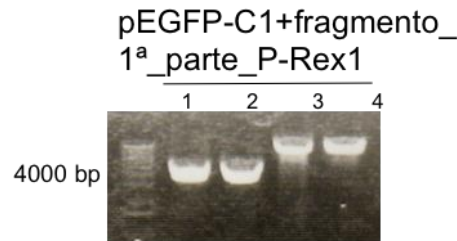


Figura 27. Gel diagnóstico de la inserción del fragmento_1ª parte_P-Rex1 en pEGFP-C1.

Como se observa en el gel anterior, las clonas 1 y 2 liberaron los fragmentos esperados por lo que se prosiguió con la segunda parte de la clonación.

II. Transformar los vectores pCEFL-EGFP-P-Rex1 y el obtenido pEGFP-C1-fragmento_1ª_parte_P-Rex1 en bacterias competentes Dam- (DNA adenine methylase) SCS110, libres de metilasas de DNA que pueden interferir con la digestión de XbaI, enzima que se utilizó en la siguiente parte de la clonación de P-Rex1 en pEGFP-C1:

- Adicionar 1.7µl de mercaptoetanol a 100µl de bacterias SCS110.

- Incubar 10 minutos (mezclar cada 2-3 minutos).
- Adicionar 1 μ l del vector (1 μ g) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Provocar choque térmico incubando a 42°C por 45 segundos.
- Incubar en hielo durante 2 minutos.
- Adicionar 900 μ l de medio SOC.
- Incubar en agitación a 37°C durante 1 hora.
- Centrifugar a 100 rpm. Quitar sobrenadante, manteniendo aproximadamente 100 μ l. Resuspender el pellet.
- Plaquear las bacterias en agar LB con antibiótico (Ampicilina para las bacterias transformadas con pCEFL-EGFP-P-Rex1 y Kanamicina para pEGFP-C1).
- Incubar a 37°C/ overnight.
- Picar una colonia de cada una de las placas de agar y crecer en 2ml de medio LB con el antibiótico correspondiente (Ampicilina para las bacterias transformadas con pCEFL-EGFP-P-Rex1 y Kanamicina para pEGFP-C1). Incubar a 37°C a 180-200rpm por 16 horas y proceder a aislar el DNA (ver Aislamiento de DNA, protocolo B). Hasta aquí ya se han obtenido ambos vectores no metilados y listos para cualquier digestión enzimática sensible a metilasas.
- Digerir con las enzimas BamHI/XbaI los vectores pEGFP-C1-fragmento_1ª_parte_P-Rex1 (para linearizarlo y tener disponibles esos sitios, fragmento \approx 8.3kb) y el vector pCEFL-EGFP-P-Rex1 que libera fragmentos de \approx 1380pb (correspondiente al fragmento de interés, P-Rex1, fragmento 2ª parte), \approx 3600pb y \approx 6800pb.

Reacciones de digestión:

<u>pCEFL-EGFP-P-Rex1:</u>	20.0µl		
NEB buffer 3, 10X:	4.0µl	<u>pEGFP-C1-fragmento_1^a_parte_P-Rex1:</u>	10.0µl
BSA 10X:	4.0µl	Buffer K, 10X:	1.0µl
BamHI (TakaRa):	2.0µl	BamHI (TakaRa):	0.5µl
XbaI (TakaRa):	2.0µl	XbaI (TakaRa):	0.5µl
Agua deionizada:	8.0µl	Agua deionizada:	8.0µl
Volumen total:	40.0µl	Volumen total:	20.0µl

Tabla 13. Preparación de vectores pEGFP-C1-fragmento_1^a_parte_P-Rex1 y pCEFL-EGFP-P-Rex1 para posterior ligación.

- Incubar a 37°C durante 3 horas.
- Purificar los fragmentos correspondientes, ver Purificación de DNA, protocolo D (*QIAEX II Agarosa Gel Extraction*) y correr un gel de agarosa al 1% para verificar la purificación y que se obtuvieron los fragmentos esperados después de las digestiones. En las siguientes imágenes se observa que la purificación del fragmento de P-Rex1 ≈1380pb, así como la linearización de pEGFP-C1-fragmento_1^a_parte_P-Rex1 y sus purificaciones fueron efectivas.

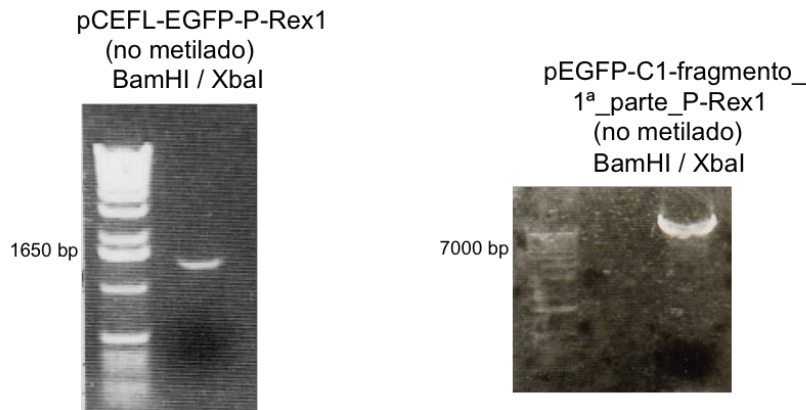


Figura 28. Purificación de los fragmentos (digeridos con BamHI / XbaI) pCEFL-EGFP-P-Rex1 y pEGFP-C1-fragmento_1^a_parte_P-Rex1.

Una vez preparado el vector y el inserto a clonar, proceder a la ligación:

pEGFP-C1- fragmento_1 ^a _parte_P-Rex1:	0.3μl
P-Rex1 (fragmento 2 ^a parte):	2.2μl
<u>Ligation High Enzyme:</u>	<u>2.5μl</u>
<u>Volumen Total:</u>	<u>5.0μl</u>

Tabla 14. Reacción de ligación de pEGFP-C1-fragmento_1^a_parte_P-Rex1 con fragmento 2^a parte de P-Rex1.

- Transformar el producto de ligación en bacterias ultracompetentes *E. coli* DH5α. y obtener su DNA (Ver Transformación de bacterias y Aislamiento de DNA protocolo B). Crecer las bacterias transformadas en medio LB y agar con Kanamicina. De las bacterias desarrolladas se evaluaron 6 colonias.
- Verificar ligación. Para comprobar la inserción del segundo fragmento de P-Rex1 y finalmente comprobar la clonación de la secuencia completa de DNA que corresponde al GEF P-Rex1 en el vector pEGFP-C1, digerir el DNA obtenido con la enzimas NheI y EcoRI esperando obtener 3 fragmentos, el primero correspondiente a EGFP por acción de NheI que reconoce un sitio justo antes de EGFP en el vector y otro antes de P-Rex1, fragmento de ≈720pb, el siguiente fragmento de ≈3.9kb correspondiente al vector pEGFP-C1 sin la secuencia que codifica para EGFP y finalmente el fragmento que corresponde a la secuencia completa de P-Rex1 ≈4.9kb.

Digestión:

<u>pEGFP-C1-P-Rex1:</u>	3.0μl
NEBuffer M:	2.0μl
NheI (TakaRa):	0.5μl
EcoRI (TakaRa):	0.5μl
Agua deionizada:	14.0μl
<u>Volumen total:</u>	<u>20.0μl</u>

Tabla 15. Digestión diagnóstica de pEGFP-C1-P-Rex1.

Las siguientes imágenes de los DNAs digeridos muestran la liberación de los fragmentos esperados. En la primera imagen se logra observar el fragmento $\approx 720\text{pb}$ de EGFP y otras bandas alrededor de 4kb que corresponderían a P-Rex1 y el vector, así que para diferenciarlas, se dejaron correr más tiempo las muestras y se volvió a visualizar el gel bajo luz UV, segunda imagen:

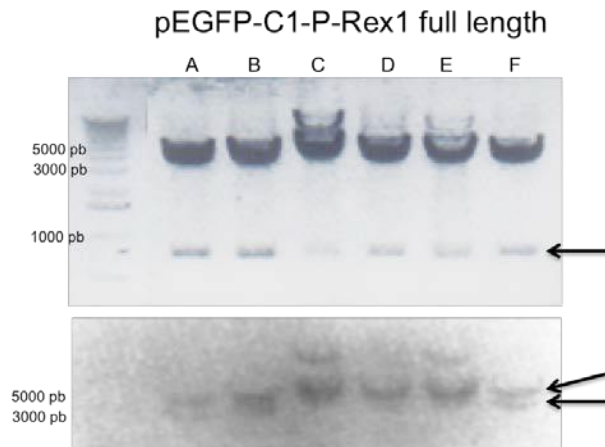


Figura 29. Gel diagnóstico de pEGFP-C1-P-Rex1 full length.

- Secuenciar la nueva construcción obtenida, pEGFP-C1-P-Rex1 con el Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), utilizando los primers respectivos del vector (pEGFP-C1).

Los resultados se muestran a continuación:

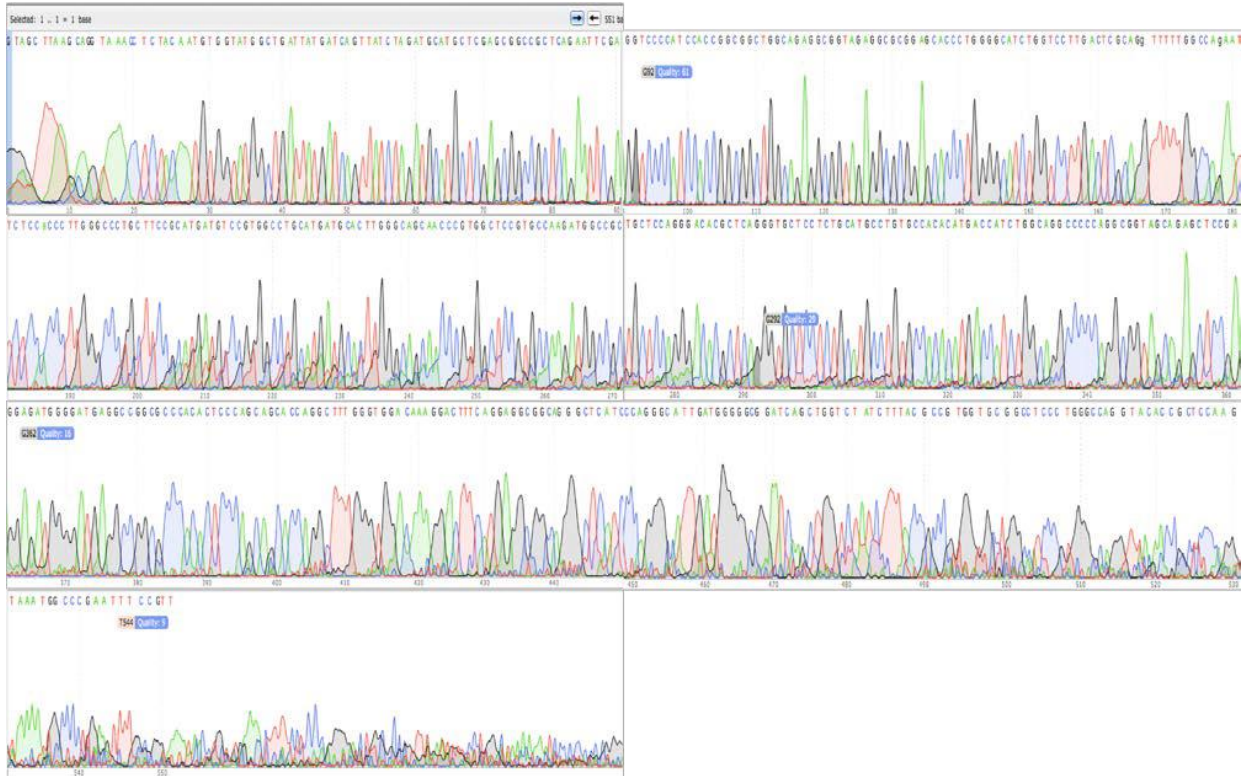


Figura 30. Secuenciación de pEGFP-C1-P-Rex1.

Esta nueva construcción fue transfectada en células 293T para probar la expresión de pEGFP-C1-P-Rex1 mediante western blot, poniendo a pEGFP-C1 vacío como control, así, se recolectaron los lisados celulares 48 horas después de la transfección y se incubaron con anticuerpo para EGFP, teniendo como resultado una buena expresión de P-Rex1 en el vector pEGFP-C1 como se muestra en la siguiente blot:

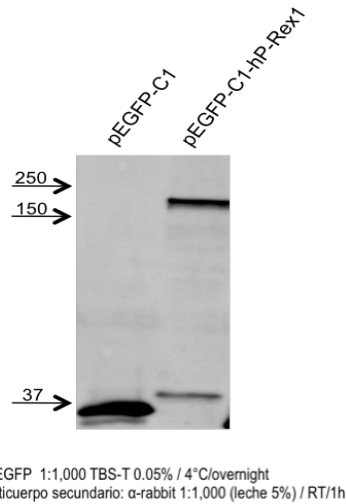


Figura 31. Detección por western blot de la construcción pEGFP-C1-hP-Rex1.

Con el fin de contar con otra forma de seguir a la subunidad reguladora PRKAR1a por microscopía de fluorescencia también se preparó la siguiente construcción:

6.11.4 pmCherry-C1-PRKAR1a:

A partir del plásmido pEGFP-C1-PRKAR1a se tomó la secuencia correspondiente a PRKAR1a y se introdujo en el vector pmCherry-C1 utilizando las enzimas de restricción BglII/NheI (Roche).

- Digerir el vector pEGFP-C1-PRKAR1a y pmCherry-C1 con las enzimas BglII/NheI.

Digestiones:

<u>pmCherry-C1:</u>	5.0 μ l	<u>pEGFP-C1-PRKAR1a:</u>	1.0 μ l
BglIII (NEB):	1.25 μ l	BglIII(NEB):	1.25 μ l
Nhe1(NEB):	1.25 μ l	Nhe1(NEB):	1.25 μ l
NEBuffer 2:	5.0 μ l	NEBuffer 2:	5.0 μ l
BSA (10X)	5.0 μ l	BSA (10X)	5.0 μ l
Agua deionizada:	32.50 μ l	Agua deionizada:	36.50 μ l
Total	50.0 μ l	Total	50.0 μ l

Tabla 16. Reacciones de digestión con Bgl II y NheI para pmCherry-C1-PRKAR1a y pmCherry-C1.

- Mediante un gel de agarosa analizar los productos de digestión y verificar si los fragmentos esperados corresponden al peso de las bandas visualizadas: EGFP: 717 pb, Cherry: 711 pb.
- Preparar gel de agarosa al 1% . Adicionar 5µl de Buffer de Carga por cada 50µl de muestra a correr en el gel. Cargar el producto total de las muestras en sus respectivos pozos.

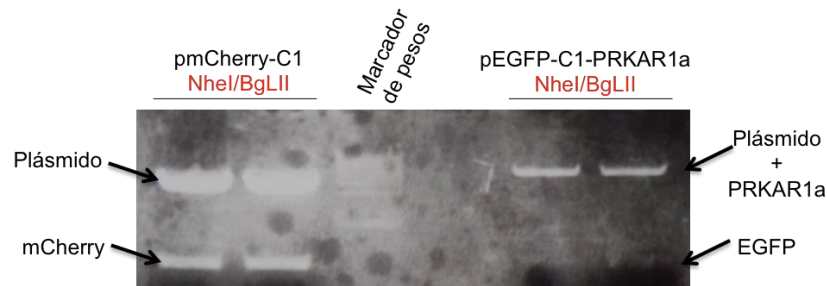


Figura 32. Gel diagnóstico para la digestión de pmCherry-C1-PRKAR1a y pEGFP-C1-PRKAR1a con Bgl II y NheI.

- Purificar los productos de digestión siguiendo el protocolo de Purificación de DNA “D” (*QIAEX II Agarosa Gel Extraction*).
- Ligar los fragmentos purificados mCherry en el plásmido que contiene a PRKAR1a.

mCherry	2.2µl
Plásmido + PRKAR1a:	0.3µl
Enzima Ligation High:	2.5µl
Total:	5.0µl

Tabla 17. Reacción de ligación para mCherry y PRKAR1a.

- Incubar 1 hora a temperatura ambiente
- Verificar la inserción del fragmento mCherry en el plásmido que contiene PRKAR1a:
 - a. Transformar bacterias competentes E.coli DH5a, siguiendo el método: TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS. Se utilizó medio SOC para el crecimiento

de las bacterias y se plaquearon los 100µl de la resuspensión final bacteriana en placas LB conteniendo el antibiótico Kanamicina al que es resistente el plásmido.

- b.** Picar y crecer colonias. Dos de las colonias desarrolladas se picaron y crecieron en medio líquido LB+Kanamicina de manera independiente y se incubaron durante 9 horas a 37°C. Se aisló el DNA de cada muestra siguiendo el Protocolo B de AISLAMIENTO DE DNA.
- c.** Comprobar la presencia del fragmento correspondiente a mCherry: digerir con BglII/NheI el DNA obtenido y resolver las muestras en agarosa al 1%.

Los dos productos digeridos se analizaron en gel de agarosa al 1%, comprobando que la construcción de pmCherry-C1-PRKAR1a fue exitosa al observar dos bandas de diferente tamaño, en donde la banda menor corresponde al fragmento de mCherry liberado con un peso aproximado a la 700 pares de bases.

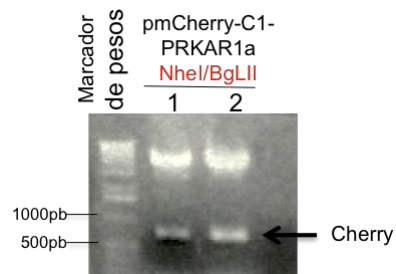


Figura 33. Gel diagnóstico para la nueva construcción de pmCherry-C1-PRKAR1a.

Esta construcción se verificó por secuenciación (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems), resultados que se muestran a continuación:

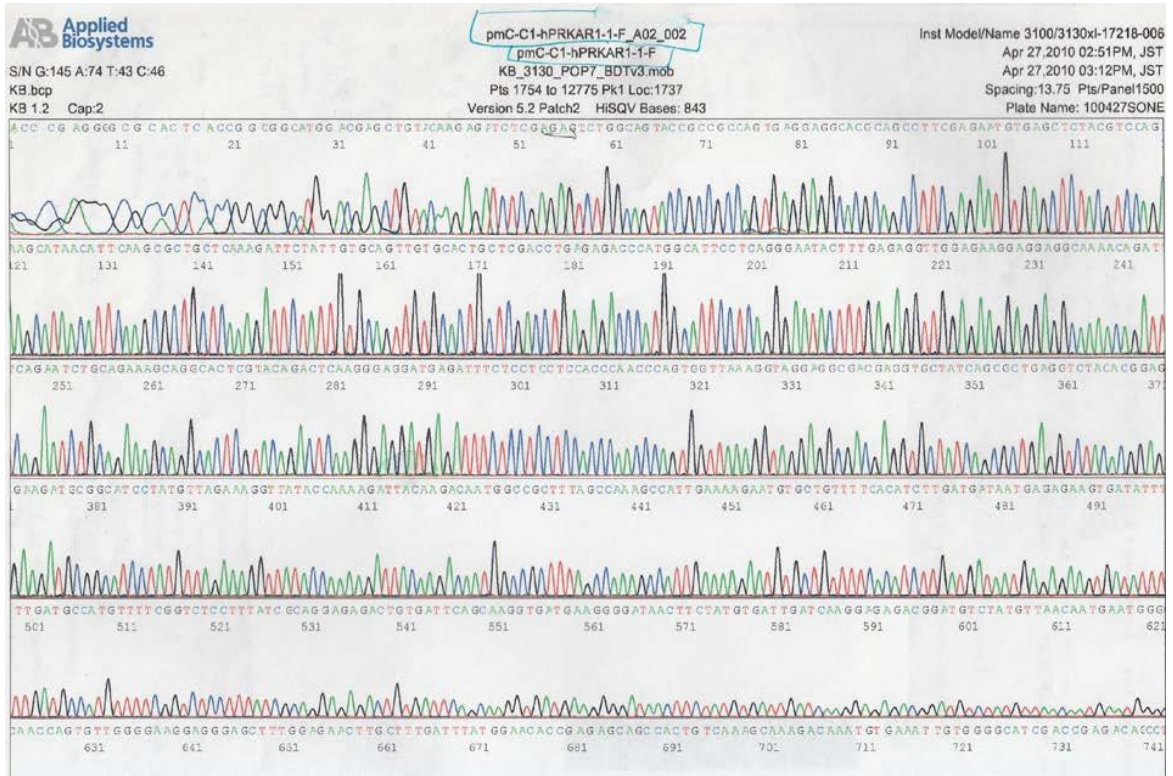


Figura 34. Secuenciación de pmCherry-C1-hPRKAR1a, clona 1.

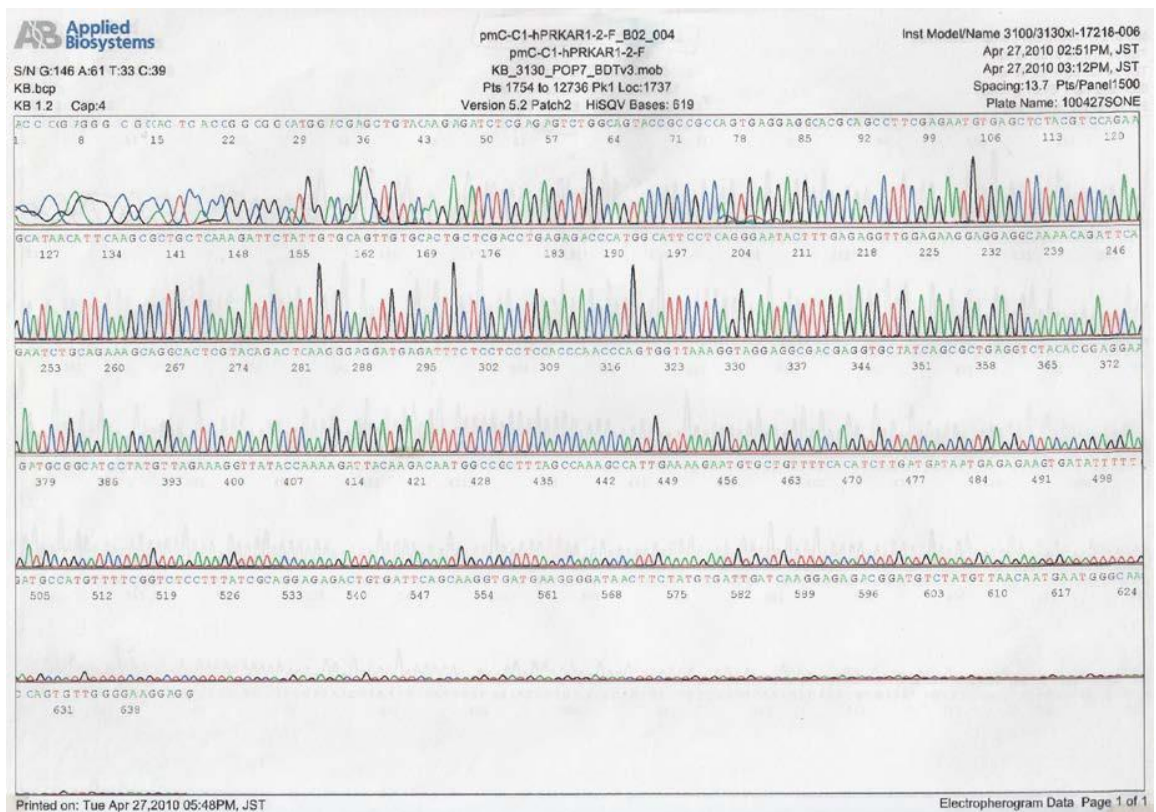


Figura 35. Secuenciación de pmCherry-C1-hPRKAR1a, clona 2.

Otra herramienta de especial importancia que se preparó fue el shRNA de la subunidad reguladora PRKAR1a para bloquear su expresión y así poder evaluar la importancia y participación de dicha proteína en algunos eventos.

6.11.5 shRNA-PRKAR1a (short hairpin RNA-PRKAR1a).

La preparación del shRNA-PRKAR1a se desarrolló de acuerdo a la siguiente estrategia:

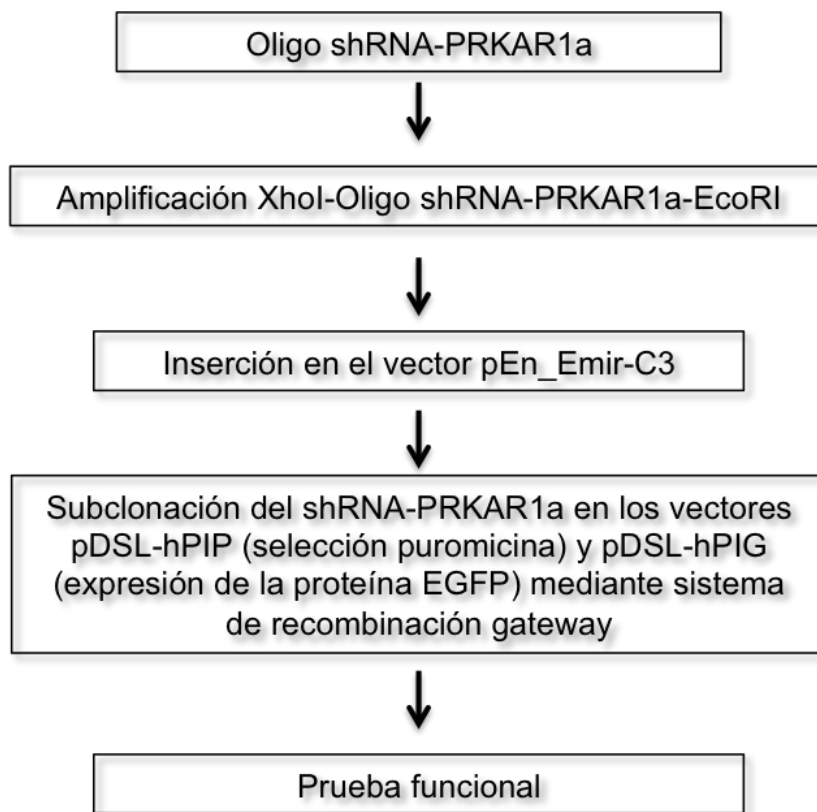


Figura 36. Plan de preparación de shRNA-PRKAR1a.

Se prepararon dos shRNA-PRKAR1a con diferentes oligos, uno preparado a partir de una secuencia seleccionada de la base de datos pública RNAi Codex página <http://codex.cshl.org>. (oligo “R”) y un segundo shRNA (oligo “C”) considerado a partir del artículo publicado en el que utilizaron un siRNA-PRKAR1a demostrando la inhibición de la expresión de PRKAR1a (Cancer Res 2009;69(18):7278–84).

RNAi Codex puede ofrecer diferentes alternativas en secuencias para la preparación de shRNAs, basta con indicar el nombre de la proteína cuya expresión se desea bloquear: Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, Database issue.

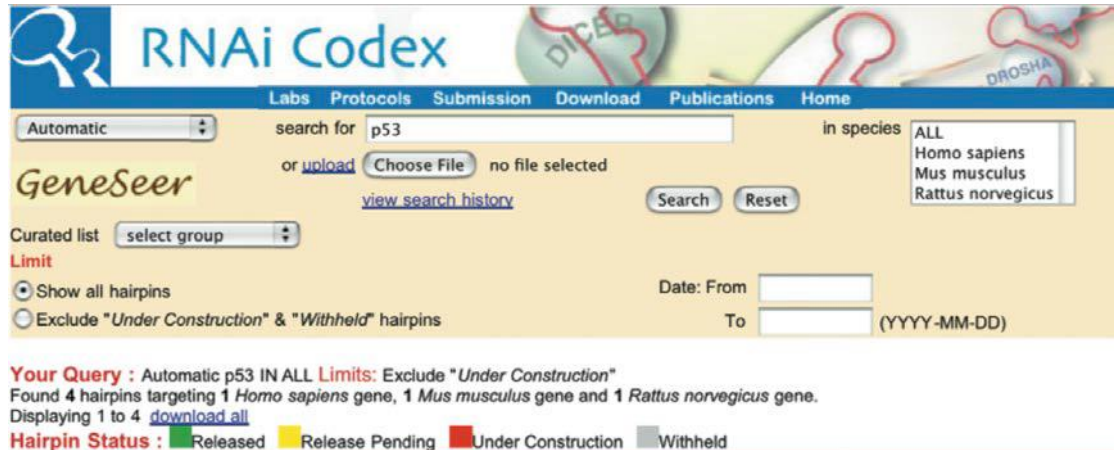


Figura 37. RNAi Codex database.

Así, se buscaron secuencias de shRNA para PRKAR1a y se obtuvo una secuencia de 19 nucleótidos (resaltada en rojo en la siguiente secuencia) y el anti sentido correspondiente a la subunidad reguladora PRKAR1a.

>PRKAR1a DNA

```

ATGGAGTCTGGCAGTACCGCCGAGTGGAGGACGCGAGCCTTCGAGAATGTGAGCTCTACGTCCAGAAGCATAACATTCAAGCGCTGCTCAA
AGATTCTATTGTGCAGTTGTGCACTGCTCGACCTGAGAGACCCATGGCATTCTCAGGAATACTTTGAGAGGTTGGAGAAGGAGGAGGCAAAA
CAGATTCAGAATCTGCAGAAAGCAGGCACTCGTACAGACTCAAGGGAGGATGAGATTTCTCTCTCCACCAACCCAGTGGTTAAAGGTAGGAG
GCGACGAGGTGCTATCAGCGCTGAGGTCTACACGGAGGAAGATGCGGCATCCTATGTTAGAAAGTTATACAAAAGATTACAAGACAATGGCC
GCTTTAGCCAAAGCCATTGAAAAGAATGTGCTGTTTTTCACATCTTGATGATAATGAGAGAAGTGATATTTTTGATGCCATGTTTTCGGTCTCCTT
TATCGCAGGAGAGACTGTGATTCAGCAAGGTGATGAAGGGGATAACTTCTATGTGATTGATCAAGGAGAGACGGATGTCTATGTTAAACAATGAA
TGGGCAACCAGTGTGGGGAAGGAGGGAGCTTTGGAGAACTTGCTTTGATTTATGGAACACCGAGAGCAGCACTGTCAAAGCAAAGACAAATG
TGAAATTGTGGGGCATCGACCGAGACAGCTATAGAAGAATCCTCATGGGAAGCACACTGAGAAAGCGGAAGATGTATGAGGAATTCCTTAGTAA
AGTCTCTATTTAGAGTCTCTGGACAAGTGGGAACGTCTACGGTAGCTGATGCATTGGAACCAAGTGCAGTTTGAAGATGGGCAGAAAGATTGTG
GTGCAGGGAGAACCAGGGGATGAGTTCTTATTATTTAGAGGGTCACTGCTGTGCTACAACGTCGGTCAGAAAATGAAGAGTTTGTGTAAG
TGGGAAGATTGGGGCTTCTGATTATTTGGTGAAATTGCACTACTGATGAATCGTCTCGTGTGCCACAGTTGTTGCTCGTGGCCCTTGAAG
TGCCTTAAGCTGGACCGACCTAGATTTGAACGTGTTCTTGCCATGCTCAGACATCCTCAAACGAAACATCCAGCAGTACAACAGTTTTGTGTC
ACTGTCTGTCTGA

```

Los datos obtenidos de la base RNAi Codex fueron los siguientes:

>ShRNA PRKAR1a

 | [HP_762061](#) | contact vendor: [Open Biosystems](#) | [comments](#)(0) | Lenti

Hairpin

TGCTGTTGACAGTGAGCGACCACTGTCAAAGCAAAGACAATAGTGAAGCCACAGATGTATTGTCTTTGCTTTGAC
AGTGGCTGCCTACTGCCTCGGA

Targets [NM_021880.1](#) (771..789) | [Prkar1a](#) | [Mus musculus](#) protein kinase,
cAMP dependent regulatory, type I, alpha

[NM_212471.1](#) (819..837) | [PRKAR1A](#) | [Homo sapiens](#) protein kinase,
cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)

[NM_013181.1](#) (734..752) | [Prkar1a](#) | [Rattus norvegicus](#) protein
kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha

La segunda secuencia para el shRNA tomada del artículo, corresponde al siRNA:

>siRNA PRKAR1A CancRes2009,69,7278 5'UGAAUGGGCAACCAGUGUU3' al que se le modificaron las bases "U", uracilo (RNA) por "T", Timina (DNA): 5'TGAATGGGCAACCAGTGTT3' y se obtuvo su secuencia reverso complemento AACACTGGTTGCCATTCA. Estas secuencias se introdujeron en el mismo esqueleto del hairpin (bases en color negro) obtenido del RNAi Codex como se muestra a continuación:

>shRNAhPRKAR1a-CancRes 69:7278

TGCTGTTGACAGTGAGCGAGtgaatgggcaaccagtgttATAGTGAAGCCACAGATGTATAaca
ctggttgccattcaCCTGCCTACTGCCTCGGA.

Los oligos fueron sintetizados en Sigma life Science y estas secuencia se flanquearon con los sitios de restricción XhoI y EcoRI adicionados mediante PCR utilizando los primers >mir30_5'XhoI CAGAAGGCTCGAGGAGGTATATTGCTGTTGACA y el >mir30_3'EcoRI CTAAAGTAGCCCCTTGAATTCCGAGGCAGTAAG para poder manipular y subclonar el shRNA en diferentes vectores.

Quality Assurance Document
sigma.com/oligos

Customer: SIGMA-ALDRICH QUIMICA, SA DE CV
Y/O BEATRIZ SANCHEZ
Customer No. 00000017700049663749

Sales Order No. 3002861898
P.O. No. 4501023909
Shipment Date

Oligo Name	Oligo #	LEN	Pur	Scale	MW	Tm	µg/OD	OD	µg	nmol	% GC	Zndary	Dimer Sequence (5'-3')
shRNA-PRKAR1aCanc	3002861898-160	97	DST	0.05	29965.7	95.3	32.1	20.8	669.7	22.3	50.52%	Very strong	No TGGCTTTGACAGTGCACCC TGCCTACTGCCTCGGA
shPRKAR1aRNAicodex	3002861898-150	97	DST	0.05	29964.7	94.8	32.2	5.5	177.2	5.9	48.45%	Strong	No TGCTGTTGACAGTGCAGGACCACTGTCAAAGCAAGACATAGTGAAGCCACAGATGTATTGCTTTGACAGTGGC TGCCTACTGCCTCGGA

Figura 38. Oligos para la preparación del shRNA-PRKAR1a.

6.11.6 Adición de los sitios XhoI (5') y EcoRI(3') a los oligos del shRNA- PRKAR1a por PCR (Sistema Expand High Fidelity):

Para cada uno de los oligos de shRNA-PRKAR1a “C” y “R” se preparó la siguiente reacción:

Agua deionizada	37.0µl
Buffer <i>Expand High Fidelity</i> 10X	5.0µl
Oligo shRNA-PRKAR1a	0.5µl
Primer 5' XhoI (50µM)	0.5µl
Primer 3' EcoRI (50µM)	0.5µl
DMSO	2.5µl
Betaína	2.5µl
dNTP's	1.0µl
<i>Taq Polimerasa</i>	0.5µl
Volumen total de la reacción	50.0µl

Tabla 18. Adición de los sitios XhoI y EcoRI a los oligos del shRNA-PRKAR1a.

Para verificar la amplificación correcta de las secuencias de shRNA-PRKAR1a “C” y “R” con los sitios de restricción, se preparó un gel de agarosa al 2% en el que se analizaron las muestras esperando ver bandas a nivel de 100 pares de bases. En la imagen siguiente, se observan las bandas que corresponden a la amplificación correcta del shRNA-PRKAR1a unido a los sitios de restricción XhoI y EcoRI (A). Después se purificó el producto de PCR mediante el método de Purificación de DNA, protocolo C: *QIAquick Gel Extraction Kit* y se corrió un gel de agarosa al 2% para verificar la purificación (B):

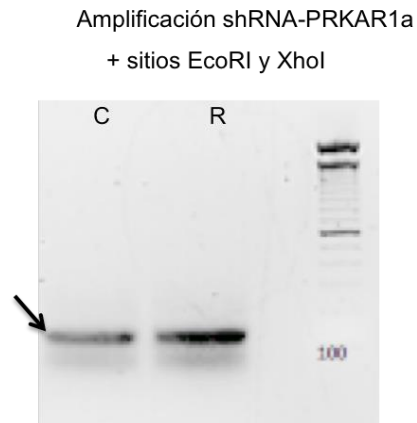


Figura 39. Gel diagnóstico para verificar la amplificación de shRNA-PRKAR1a (C) y shRNA-PRKAR1a (R).

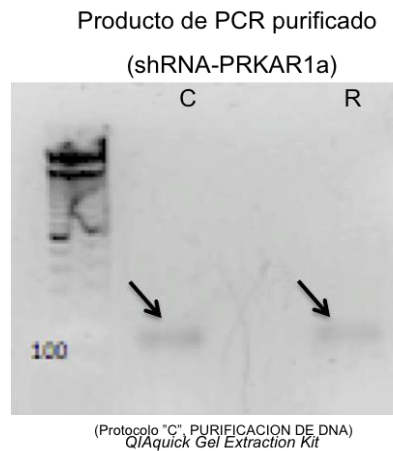


Figura 40. Purificación de los productos de PCR: shRNA-PRKAR1a (C y R).

El vector en donde se insertaría la secuencia para bloquear la expresión de PRKAR1a es pEn_Emir-C3:

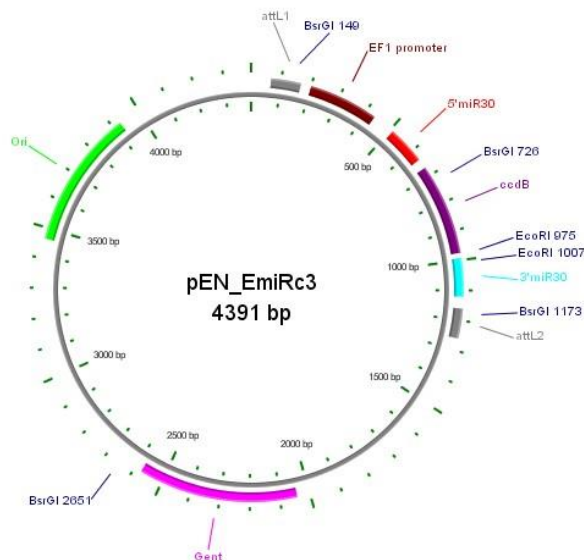


Figura 41. Mapa del vector pEn-Emir-C3.

Así, se restringió con las enzimas XhoI y EcoRI el vector vacío pEn_Emir-C3 y los shRNA-PRKAR1a (amplificados y purificados) para tener disponibles los sitios de reconocimiento entre el vector y el inserto (shRNA).

Reacciones de digestión:

Digestión	shRNA-PRKAR1a*	pEn_Emir-C3*
Agua deionizada	0.5µl	15.0µl
Buffer H	2.5µl	2.0µl
DNA* (“C” o “R”)	20.0µl	2.0µl
XhoI	1.0µl	0.5µl
EcoRI	1.0µl	0.5µl
Volumen total	25.0µl	20.0µl

Tabla 19. Reacciones de digestión (con XhoI/ EcoRI) del shRN-PRKAR1a y pEn_Emir-C3.

El vector pEn_Emir-C3, digerido con las enzimas XhoI/EcoRI y analizado en un gel de agarosa al 1% (Figura 42), fue posteriormente purificado (Figura 43). En esta última imagen se muestra la banda única correspondiente al vector pEn_Emir-C3 linearizado.

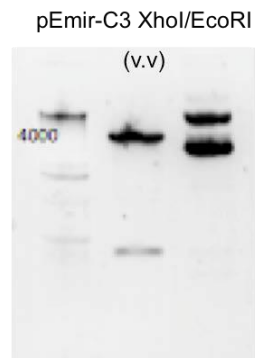


Figura 42. Digestión con XhoI / EcoRI de pEn_Emir-C3.

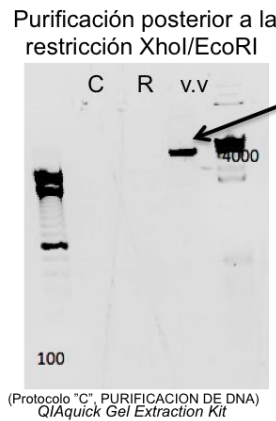
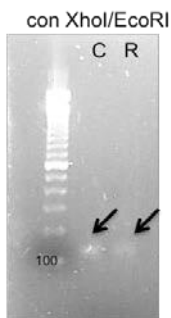


Figura 43. Purificación de pEn-Emir-C3 linearizado.

La purificación de los productos de digestión, en el caso del vector pEn_Emir-C3 fue por gel, utilizando el protocolo C, *QIAquick Gel Extraction Kit* mientras que los fragmentos “C” y “R” correspondientes a los dos shRNA al purificarse por el mismo método, las bandas en el gel no fueron visualizadas, así que una nueva purificación se hizo por el protocolo A de *GenClean* para aumentar el rendimiento de los productos como se muestra en la figura siguiente:

Purificación posterior a restricción



Protocolo "E", PURIFICACION
DNA GenClean.

Figura 44. Purificación de shRNA-PRKAR1a (C y R).

Inserción del shRNA-PRKAR1a en el vector pEn_Emir-C3.

Los fragmentos ya listos del vector e inserto (shRNA-PRKAR1a) se unieron.

Ligación: la siguiente reacción se hizo para cada uno de los dos shRNAs a insertar, de manera independiente en el vector pEn_Emir-C3.

Vector pEn_Emir-C3	0.5µl
shRNA-PRKAR1a ("C", "R")	7.5µl
Buffer 10X	1.0µl
T4 ligasa	1.0µl
Volumen total	10.0µl

Tabla 20. Reacción de ligación para pEn_Emir-C3 con shRNA-PRKAR1a (C y R).

- Incubar a 16°C/overnight.

El total de cada una de las ligaciones fue utilizado para transformar bacterias competentes DH5α por el protocolo TRANSFORMACION DE BACTERIAS (utilizando en el caso, medio adicionado con el antibiótico Gentamicina al 30% para el cual pEn_Emir-C3 es resistente) y se dio seguimiento a 5 colonias provenientes de la ligación del shRNA-

PRKAR1a-CancerResearch, “C” (C1-C5) y 4 del shRNA-PRKAR1a_RNAiCodex, “R” (R1-R4). Después se siguieron los protocolos de Aislamiento de DNA y Purificación de DNA para finalmente hacer una digestión con BamHI y XbaI (Tabla 21) y evaluar con un gel de agarosa al 1% la inserción de los shRNAs esperando ver un fragmento aproximado a 700 pares de bases indicando la ligación del shRNA (Figura 45).

Digestión:

Plásmido a evaluar	8.0µl
Buffer B (Roche)	1.0µl
BamHI (Roche)	0.5µl
XbaI (Roche)	0.5µl
Volumen total	10.0µl

Tabla 21. Reacción de digestión para evaluar la inserción del shRNA-PRKAR1a en el vector pEn_Emir-C3.

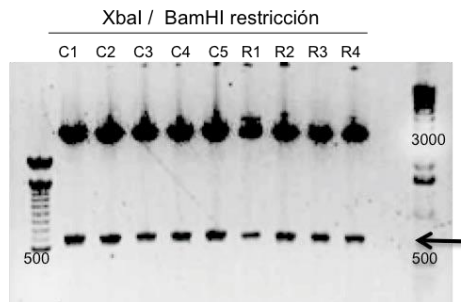


Figura 45. Gel para verificar la clonación de los shRNA-PRKAR1a (C y R) en el vector pEn-Emir_C3.

Una vez insertado el shRNA-PRKAR1a en el vector pEn_Emir-C3 se realizó una prueba funcional del shRNA en células 293T transfectadas bajo el protocolo de Transfección celular a una confluencia del 70%, en placas de 6 pozos (consideradas para la transfección, como p35), con un tiempo de incubación con los liposomas de 3 horas. Se transfectaron 2µg de cada uno de los shRNA a probar, pEn_Emir-C3-shRNA-PRKAR1a-CancerResearch, “C” (C1-C5) y 4 del pEn_Emir-C3-shRNA-PRKAR1a_RNAiCodex, “R”, sobreexpresando al mismo tiempo 0.5µg de la subunidad reguladora pCDNA3.1-HA-PRKAR1a, teniendo como

control negativo células transfectadas solamente con la subunidad reguladora PRKAR1a. 48 horas después de la transfección se obtuvieron los lisados totales celulares (ver protocolo de Pull down e Inmunoprecipitación) que se corrieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membrana inmobilon. Se hizo el western blot incubando con el anticuerpo HA dilución 1:10,000 a 4°C/overnight y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-mouse dilución 1:10,000 en leche al 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente. La imagen siguiente (Figura 46) muestra el efecto bloqueador de la expresión de PRKAR1a con todos los shRNAs probados, siendo evidente el efecto de pEn-Emir-C3-shRNA-PRKAR1a en la clona C3 y R4.

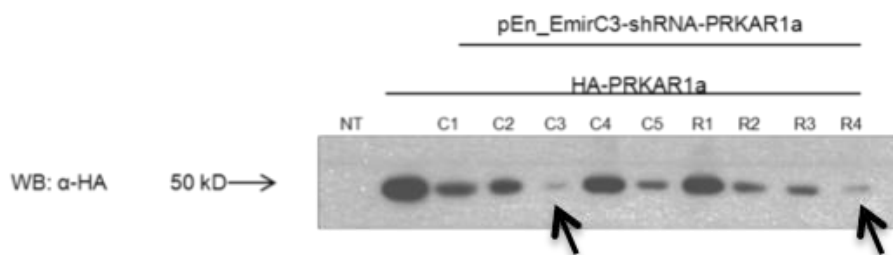


Figura 46. Bloqueo de la expresión de HA-PRKAR1a en células HEK293T por diferentes clonas de pEn-Emir_C3-shRNA-PRKAR1a.

Una vez verificado el bloqueo de la expresión de HA-PRKAR1a, se subclonó el shRNA en los vectores pDSL-hpIP y pDSL-hpIG (Figura 47) mediante el sistema de recombinación Gateway, lo que permite la selección con puomicina de células transfectadas con el plásmido pDSL-hpIP-shRNA-PRKAR1a, mientras que pDSL-hpIG-shRNA-PRKAR1a ofrece la posibilidad de detectar células transfectadas con dicho shRNA mediante microscopía de fluorescencia o el uso de anticuerpos para EGFP (secuencia presente en el vector). Así, el vector pEn_EmiR-C3 recombina con los vectores lentivirales pDSL-hpIP y pDSL-hpIG introduciendo el shRNA-PRKAR1a en el contexto de mir30 y con el promotor EF-1 α .

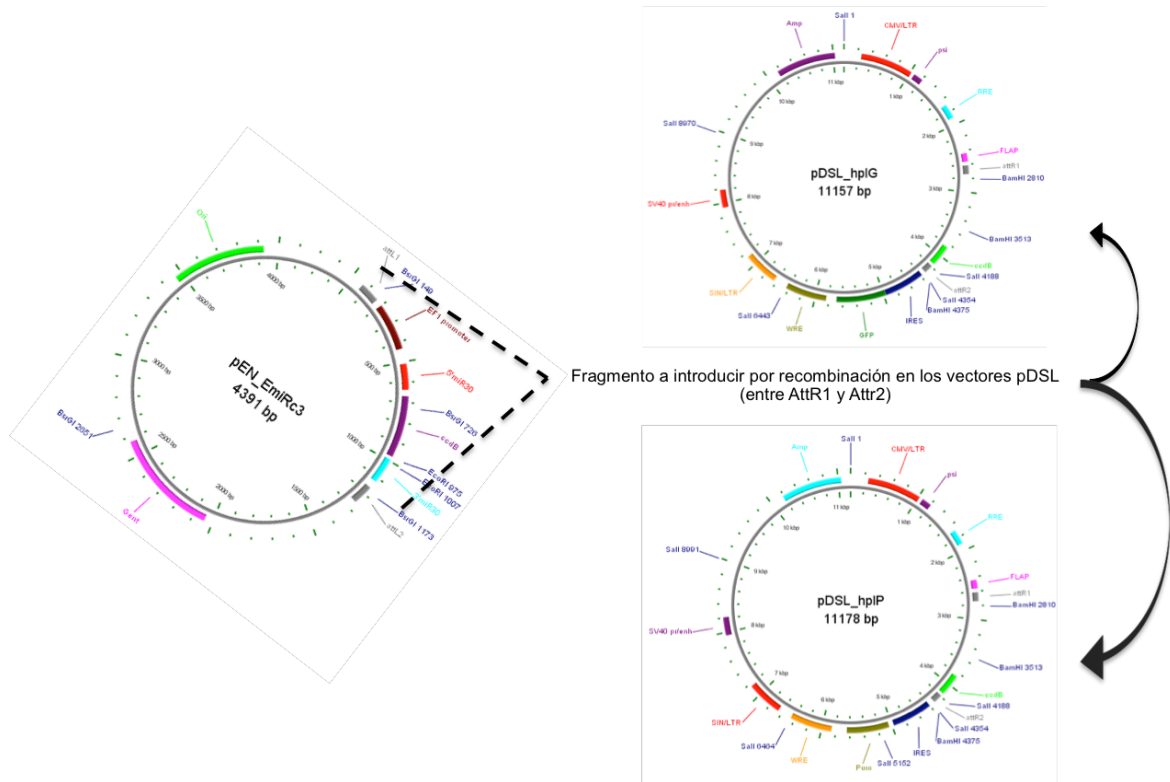


Figura 47. Plan de subclonación de pEn-Emir_C3-shRNA-PRKAR1a en los vectores lentivirales pDSL_hpIG y pDSL_hpIP.

Para la subclonación del shRNA-PRKAR1a se calcularon los tamaños de los fragmentos a obtener después de la restricción de pEn-Emir_C3 y de la recombinación con los vectores lentivirales (Tabla 22).

Fragmento en pEn-Emir-C3	Nucleótidos
Fragmento eliminado por restricción inicial con XhoI/EcoRI	- 402
Región de recombinación AttI1 y AttI2 en pEn-Emir-C3	1193
shRNA-PRKAR1a (clonado como XhoI/EcoRI)	+ 137
Tamaño del fragmento recombinado	928

Tabla 22. Fragmentos obtenidos para la subclonación del shRNA-PRKAR1a en los vectores pDSL_hpIP y pDSL_hpIG.

Se prepararon las siguientes reacciones de recombinación:

Vector destino:	pDSL-hpIG (0.16 λ) 1.0 μ l (200 ng)	pDSL-hpIG (0.3 λ) 1.3 μ l (400ng)
Vector de entrada: (pEn_Emir-C3-shRNA-PRKAR1a_RNAiCodex)	0.5 μ l (100 ng)	0.5 μ l (100ng)
Buffer EB:	2.5 μ l	5.0 μ l
Clonasa LR II:	0.5 μ l	0.5 μ l
Agua deionizada:	0.5 μ l	2.7 μ l
Volumen total	5.0 μ l	10.0 μ l

Tabla 23. Reacción de recombinación por Sistema Gateway, pDSL (hpIP y hpIG) con pEn_Emir-C3-shRNA-PRKAR1a.

Temperatura de incubación: 22°C / overnight

Bacterias competentes DH5 α fueron transformadas con el producto de recombinación y se obtuvo su DNA (ver Transformación de bacterias y Aislamiento de DNA, protocolo A) y para comprobar la reacción de recombinación se digirió el DNA de diferentes clonas obtenidas con XhoI (existe un sitio de reconocimiento para la enzima XhoI a una distancia de 389 del attL2 en pEn-Emir-C3 mientras que pDSL-hpIP tiene un único sitio XhoI al final de attR2) incubando a 37°C/overnight y esperando una banda con un peso de 389 nucleótidos. La reacción de recombinación Gateway fue exitosa como se muestra en las siguientes imágenes en donde se observa la liberación de fragmento con el peso esperado (~ 389 nucleótidos) al digerir con XhoI a pDSL-hpIG-shRNA-PRKAR1a (Figura 48) y pDSL-hpIP-shRNA-PRKAR1a (Figura 49).

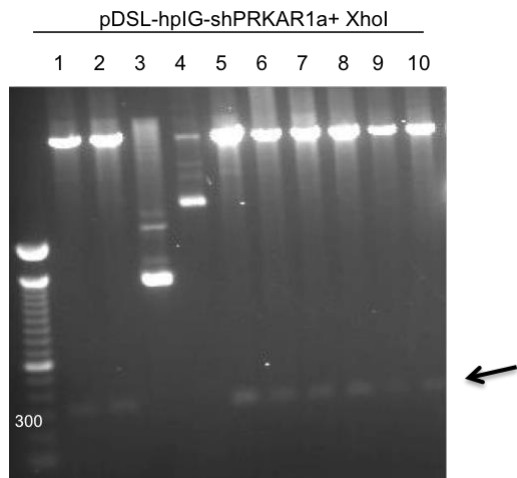


Figura 48. Gel diagnóstico de la restricción con XhoI de pDSL-hpIG-shRNA-PRKAR1a.

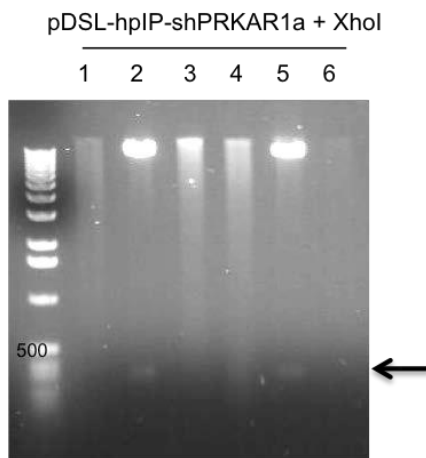
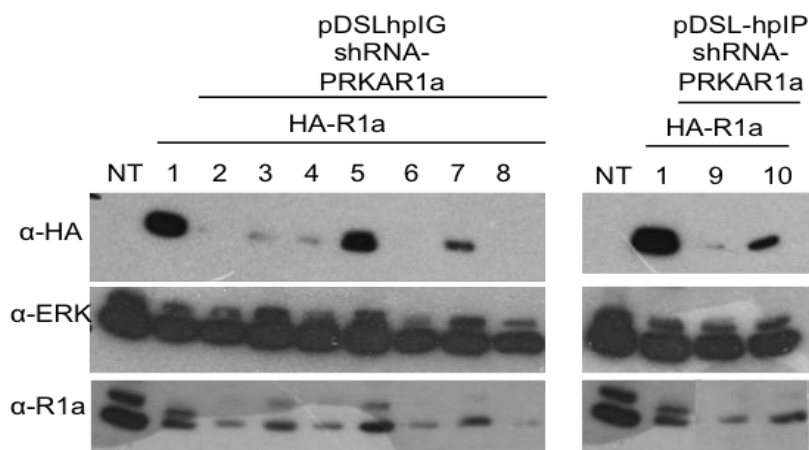


Figura 49. Gel diagnóstico de la restricción con XhoI de pDSL-hpIP-shRNA-PRKAR1a.

Para probar el funcionamiento de los shRNA-PRKAR1a se transfectaron células HEK293T (lipofectamine y Plus) sobreexpresando a HA-PRKAR1a (10ng) junto con el shRNA de PRKAR1a (1.5 μ g), dejando como control negativo células que solamente fueron transfectadas con PRKAR1a. Los lisados totales se obtuvieron a las 48 horas después de la

transfección, se analizaron las muestras en SDS-PAGE 10% y se transfirieron las proteínas a membrana inmobilon a 320mAmp/2.5h.

En la siguiente imagen se puede ver que las clonas 2, 3, 4, 6 y 8 del plásmido pDSL-hpIG-shRNA-PRKAR1a disminuyen la expresión de HA-PRKAR1a al igual que la clona 9 de pPDSL-hpIP-shRNA-PRKAR1a.



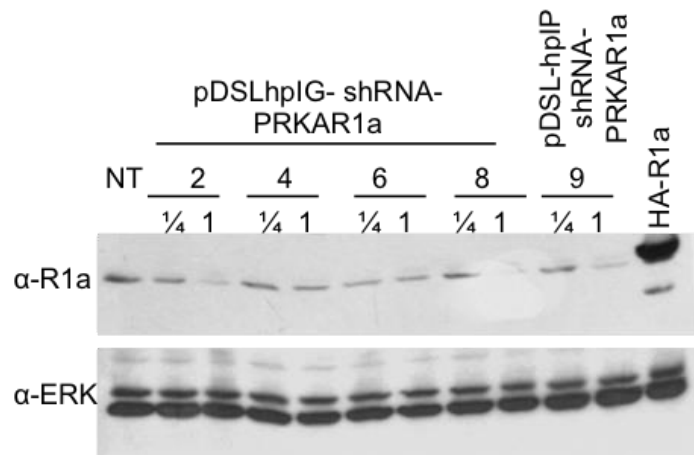
α -HA 1:10,000 TBS-T 0.05% / 4°C /overnight
 Anticuerpo secundario: α -mouse 1:10,000 (leche 5%)/RT/1h

α -ERK2 1:10,000 TBS-T 0.05% / 4°C /overnight
 Anticuerpo secundario: α -rabbit 1:10,000 (leche 5%)/RT/1h

α -R1a 1:5,000 TBS-T 0.05% / 4°C /overnight
 Anticuerpo secundario: α -mouse 1:5,000 (leche 5%)/RT/1h

Figura 50. Efecto de diferentes clonas de shRNA-PRKAR1a (pDSL-hpIG y pDSL-hpIP) en la expresión de HA-PRKAR1a en células HEK293T.

Posteriormente se probó el funcionamiento de los shRNAs sobre la expresión endógena de PRKAR1a. Se transfectaron células HEK293T con 500ng (1/4) y 2 μ g (1) de shRNA-PRKAR1a poniendo como controles, células no transfectadas (NT) y otras transfectadas sólo con HA-PRKAR1a. Los lisados totales se obtuvieron a las 72 horas después de la transfección, se analizaron las muestras en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron las proteínas a membrana inmobilon (320 mAmp/2.5h). Como se observa en la imagen siguiente al evaluar los niveles de expresión de la subunidad reguladora con el anticuerpo anti-R1a, 2 μ g de shRNA-PRKAR1a disminuyen de manera importante la expresión de PRKAR1a (clonas 2, 8 y 9), como control de expresión se muestra el western blot anti ERK.



α -R1a 1:10,000 TBS-T 0.05% / 4°C /overnight
 Anticuerpo secundario: α -mouse 1:10,000 (leche 5%)/RT/1h

 α -ERK2 1:10,000 TBS-T 0.05% / 4°C /overnight
 Anticuerpo secundario: α -rabbit 1:10,000 (leche 5%)/RT/1h

Figura 51. Efecto de diferentes clones de shRNA-PRKAR1a (pDSL-hpIG y pDSL-hpIP) en la expresión endógena de PRKAR1a en células HEK293T.

Se hizo un análisis para ver si la expresión de la subunidad reguladora PRKAR1a en las células COS-7 también podría ser disminuida con los mismos shRNAs de PRKAR1a diseñados para bloquear a PRKAR1a de origen humano, encontrando también en las células COS-7 la secuencia que hibrida con PRKAR1a en humanos y que por tanto, teóricamente hace posible su inhibición. Así, se probaron los shRNAs de PRKAR1a en células COS-7 transfectando 500ng (1/4) y 2 μ g (1) de shRNA-PRKAR1a, dejando como control células transfectadas con HA-PRKAR1a. Las células fueron lisadas después de 72 horas y las muestras se corrieron en SDS-PAGE-10% y se hizo la transferencia de las proteínas a membrana inmobilon a 320mAmp/2.5 horas. Se hizo el western blot buscando detectar a la subunidad reguladora PRKAR1a transfectada mediante el anticuerpo HA y también con anti-PRKAR1a (α -R1a) para detectar a la proteína endógena. La siguiente imagen muestra la disminución de PRKAR1a cuando se transfectan 2 μ g de shRNA-PRKAR1a. Por tanto, se comprueba nuevamente la disminución de la expresión de la subunidad reguladora HA-PRKAR1a transfectada, así como de PRKAR1a endógena en células COS-7.

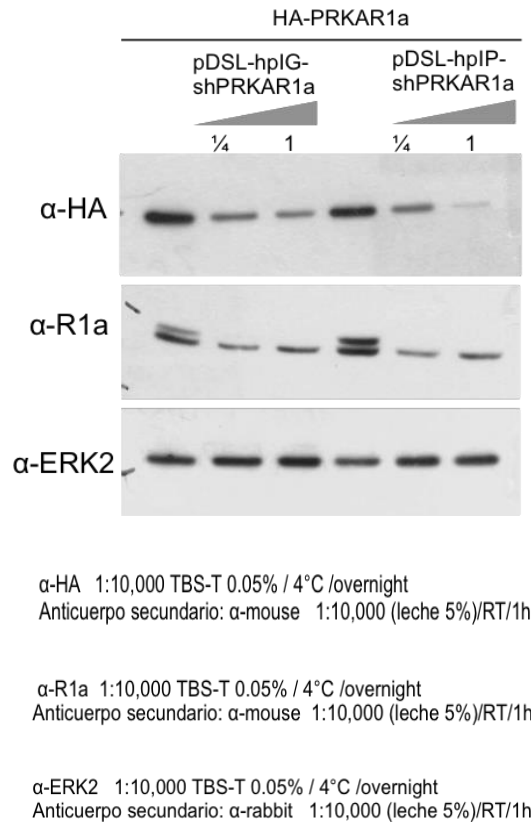


Figura 52. Bloqueo de la expresión de HA-PRKAR1a en células COS-7 mediante pDSL (hpIP y hpIG)-shRNA-PRKAR1a.

Se repitió el experimento en las células COS-7 transfectadas únicamente con los shRNA-PRKAR1a (pDSL-hpIG y pDSL-hpIP) 500ng y 2μg. Después de 72 horas de transfección se lisaron las células y se analizaron las muestras. La siguiente imagen muestra una disminución de la expresión de PRKAR1a endógena cuando se transfectaron 2μg del shRNA-PRKAR1a, siendo más efectivo el pDSL-hpIP para la inhibición de PRKAR1a endógena.

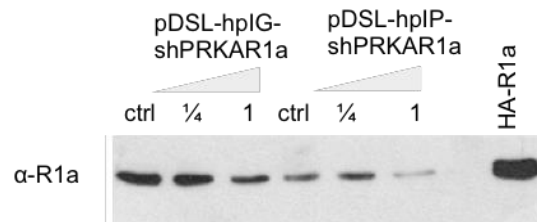


Figura 53. Bloqueo de la expresión endógena de PRKAR1a en células COS-7 mediante pDSL- (hpIP y hpIG)-shRNA-PRKAR1a.

Hasta aquí, con el shRNA-PRKAR1a se tuvo lista una de las herramientas importantes a utilizar en el presente proyecto para poder evaluar la participación, importancia y efectos de PRKAR1a en eventos como los son el cierre de herida y la quimiotaxis.

Con la finalidad de investigar un poco más sobre lo concerniente a la proteína cinasa A y a sus componentes, se diseñaron primers para evaluar su expresión mediante RT PCR en diferentes líneas celulares y su posterior aplicación en experimentos que requirieran evaluar de manera endógena su importancia y participación

Otros primers diseñados durante el presente proyecto fueron para las diferentes subunidades de PKA: hPRKAR1a, hPRKAR1b, hPRKAR2a, hPRKAR2b, hPRKACalpha, hPRKACbeta, y hPRKACgamma con la finalidad de evaluar su expresión mediante RT PCR en diferentes líneas celulares y su posterior aplicación en experimentos que requirieran evaluar de manera endógena su importancia y participación. A continuación se enlistan los primers diseñados y enviados a sintetizar a Sigma-Aldrich Química:

Quality Assurance Document
sigma.com/oligos

Customer. SIGMA-ALDRICH QUIMICA, SA DE CV Sales Order No. 3002861898
Y/O BEATRIZ SANCHEZ P.O. No. 4501023909

Oligo Name	Oligo #	LEN	Pur	Scale	MW	Tm	µg/OD	OD	µg	nmol	% GC	2ndary	Dimer Sequence (5'-3')	
1) hPRKAR1a-5' RTpcr	3002861898-010	20	DST	0.05	6209.0	63.9	30.0	9.5	284.2	45.8	55.00%	None	No	GGGAAGCACACTGAGAAAGC
hPRKAR1a-3' RTpcr	3002861898-020	20	DST	0.05	6030.9	63.9	31.9	6.7	212.9	35.3	55.00%	Weak	No	ACAGCAGCTGACCCCTCTAA
2) hPRKAR1b-5' RTpcr	3002861898-030	20	DST	0.05	6191.0	63.8	30.8	10.8	334.0	54.0	55.00%	Weak	No	AGCACTTCGAGAAGCTGGAG
hPRKAR1b-3' RTpcr	3002861898-040	20	DST	0.05	6067.8	63.9	33.0	8.8	290.5	47.9	50.00%	Moderate	No	CTTGGGAATCACCTTCTCTGA
3) hPRKAR2a-5' RTpcr	3002861898-050	20	DST	0.05	6079.9	63.9	30.7	5.6	170.6	28.1	55.00%	Very weak	No	ATGTACACACCCCGAGAGC
hPRKAR2a-3' RTpcr	3002861898-060	20	DST	0.05	6246.0	63.8	30.4	7.1	214.4	34.3	50.00%	None	No	TGATTTAAGGAGGGGCACAG
4) hPRKAR2b-5' RTpcr	3002861898-070	20	DST	0.05	6156.9	63.7	31.6	8.7	275.2	44.9	50.00%	Moderate	No	GGCGAACTGGCCTTAATGTA
hPRKAR2b-3' RTpcr	3002861898-080	20	DST	0.05	6119.0	63.6	30.1	6.4	191.9	31.4	45.00%	Very weak	No	AGGCGTTCAGAAAATCCAA
5) hPRKACalpha-5' RTpcr	3002861898-090	20	DST	0.05	6078.9	64.2	30.5	6.0	183.8	30.2	45.00%	None	No	TCCAACACACCTGAATGAA
hPRKACalpha-3' RTpcr	3002861898-100	20	DST	0.05	6110.9	64.2	31.0	8.6	267.4	43.8	55.00%	Moderate	No	CCAGCGAGTGCAGATACTCA
6) hPRKACbeta-5' RTpcr	3002861898-110	20	DST	0.05	6092.9	63.6	32.7	8.5	277.3	45.5	55.00%	None	No	CACGGTTCATGCAGCTCAG
hPRKACbeta-3' RTpcr	3002861898-120	20	DST	0.05	5965.8	63.6	32.7	9.9	325.1	54.5	50.00%	None	No	CTAATGCCACCAATCCACT
7) hPRKACgamma-5' RTpcr	3002861898-130	20	DST	0.05	6045.9	63.9	31.7	8.6	271.6	44.9	50.00%	Weak	No	AAGCCCGAGAATCTCCTCAT
hPRKACgamma3RTpcr	3002861898-140	20	DST	0.05	6203.9	64.0	32.4	8.9	289.3	46.6	55.00%	None	No	TAGATCTGGATGGGCTGGTC

Figura 54. Primers para diferentes subunidades de PKA.

Subunidad de PKA	5'RTper	3'RTper
hPRKAR1a	GGGAAGCACACTGAGAAAGC	ACAGCAGCTGACCCCTCTAA
hPRKAR1b	AGCACTTCGAGAAGCTGGAG	CTTGGGAATCACCTTCCTGA
hPRKAR2a	ATGTACAACACCCCGAGAGC	TGATTTAAGGAGGGGCACAG
hPRKAR2b	GGCGAACTGGCCTTAATGTA	AGGCGTTCAGAAACTCCAA
hPRKACalpha	TCGAACACACCCTGAATGAA	CCAGCGAGTGCAGATACTCA
hPRKACbeta	CACGGTTCTATGCAGCTCAG	CTAATGCCACCAATCCACT
hPRKACgamma	AAGCCCGAGAATCTCCTCAT	TAGATCTGGATGGGCTGGTC

Tabla 24. Primers para diferentes subunidades de PKA.

Los primers se reconstituyeron adicionando agua deionizada y se llevaron a una concentración de 100µmol (stock) a partir de la que se preparó la alícuota de trabajo (10µmol).

Para evaluar la expresión de las diferentes subunidades de PKA en las líneas celulares HEK293T, HeLa y de especial interés en las células endoteliales microvasculares de origen humano, HMEC (por el hecho de que estas células endoteliales participan de manera importante en la migración celular, evento que se lleva a cabo en la angiogénesis tumoral) se hicieron PCRs teniendo como templado cDNA obtenido de dichas líneas celulares. Se utilizó el kit *Jump Start™ Red Taq® Ready Mix™ PCR Reaction Mix* (Cat. No P0982, Sigma).

Reacción (para cada una de las subunidades de PKA a evaluar y para cada una de las líneas celulares a probar) :

<i>Jump Start™ Red Taq® Ready Mix™</i> :	7.5µl
Primer 5' [10µM]:	1.0µl

Primer 3' [10 μ M]:	1.0 μ l
Templado (cDNA de la línea celular) 40-100ng:	1.0 μ l
DMSO:	1.0 μ l
Agua deionizada:	5.0 μ l
Volumen final:	16.5 μ l

Tabla 25. Reacción para la amplificación de las diferentes subunidades de PKA.

Temperaturas utilizadas durante las PCR:

Desnaturalización:	94°C / 5 min	
Alineación:	94°C / 30 seg	} (30 ciclos)
	64°C / 30 seg	
	72°C / 1 min	
Elongación:	72°C / 10 min	

Tabla 26. Condiciones de PCR para amplificación de diferentes subunidades de PKA.

Se analizó la expresión de las diferentes subunidades de PKA en las líneas celulares HMEC, HEK293T y HeLA usando su cDNA como templado. La expresión se evaluó analizando los diferentes productos de PCR en geles de agarosa al 2%.

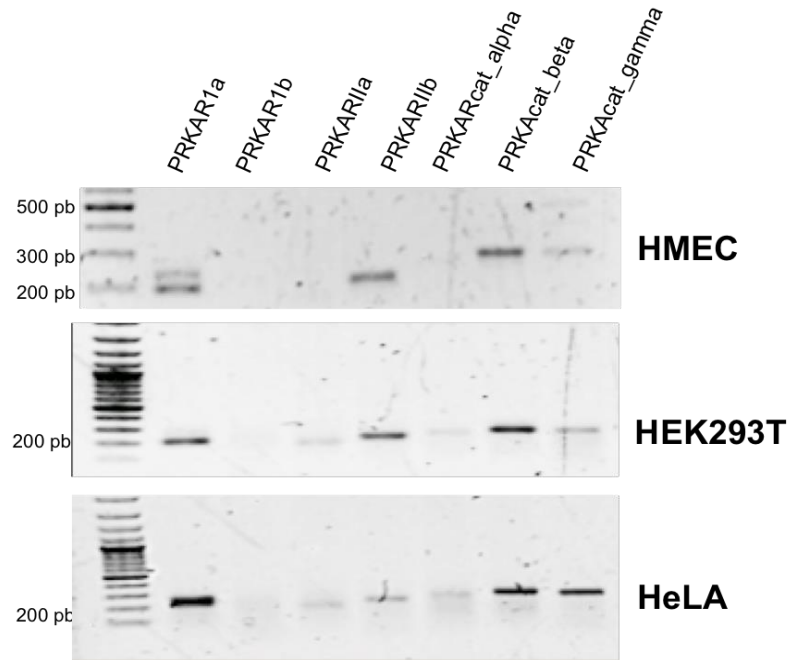


Figura 55. Expresión de diferentes subunidades dePKA en las líneas celulares: HMEC, HEK293T y HeLA.

Los geles de la figura anterior demuestran que las subunidades reguladoras de la proteína cinasa A: PRKAR1a, PRKAR1b, PRKARIIa y PRKARIIb se expresan en las células HEK293T y HeLA de igual forma que las subunidades catalíticas PRKACalpha, PRKACbeta y PRKACgamma, algunas en menor o mayor grado, pero están presentes en ambas líneas celulares, sin embargo, en las células endoteliales HMEC, inicialmente parecía que PRKAR1b, PRKARIIa y PRKACalpha no se estaban expresando o no se estaba alcanzando a detectar su expresión, así que se modificaron los ciclos de la PCR aumentándolos a 35 de manera que se logró detectar la expresión de PRKARIIa y PRKACalpha en las HMEC, pero no la subunidad reguladora PRKAR1b. Así mismo se verificó la expresión en estas células de PRKAR1a, PRKARIIb y las subunidades catalíticas beta y gama como se muestra en el siguiente gel:

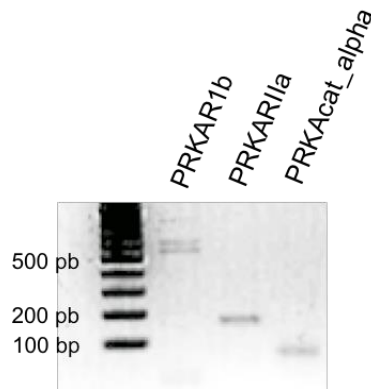


Figura 56. Expresión de PRKAR1b, PRKAR1a y PRKAcet_alpha (35 ciclos en PCR).

7. RESULTADOS

Dada la importancia del GEF P-Rex1 como regulador de procesos de migración celular, particularmente en células endoteliales en las que participa en la cascada de receptores CXCR4, interviniendo en la activación de Rac, migración celular y respuesta angiogénica determinada *in vitro*, en células estimuladas con SDF1, decidimos investigar los mecanismos moleculares que regulan la función de este importante GEF. Para ello, partimos de nuestras propias evidencias de una interacción entre el GEF P-Rex1 y la proteína cinasa A. Particularmente, postulamos que esta interacción, inicialmente demostrada entre los dominios PDZ-PDZ del GEF P-Rex1 y la región carboxilo terminal de la proteína PRKAR1a, subunidad reguladora de la proteína cinasa A, asociación encontrada en un ensayo de doble híbrido en levaduras en que se utilizó como carnada a los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 y una librería de cDNAs proveniente de células endoteliales HMEC (human microvascular endothelial cells) preparada en nuestro laboratorio (Chavez-Vargas, 2007, Tesis de Maestría), ocurriría entre proteínas completas y sería relevante para la función del GEF P-Rex1, así como para la dinámica celular de la cinasa PKA. Así pues, nos propusimos caracterizar la asociación PDZ-PDZ-P-Rex1 con el fragmento denominado Z6 (correspondiente al segundo dominio de unión de AMPc en el carboxilo terminal de la subunidad reguladora PRKAR1a) para demostrar la formación de dichos complejos en células de mamífero, extendiendo hacia un sistema biológicamente relevante, el resultado obtenido en levaduras. Ahora en células de mamífero HEK293T se buscó elucidar posibles formas de regulación del GEF P-Rex1 mediadas por

PKA. Con este propósito, se inició por co-transfectar células HEK293T con los plásmidos pCEFL-3XFlag-EGFP-Z6 (presa) y pCEFL-GST-PDZ-PDZ-P-Rex1 (carnada). Después de 48 horas de la transfección se obtuvieron los lisados celulares y mediante la técnica de pull down, utilizando perlas de glutatión sefarosa, se aislaron los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 fusionados a GST. Para probar si la asociación entre ambas proteínas se estaba llevando a cabo, se hizo un western blot utilizando el anticuerpo contra flag, para detectar la asociación con Z6. Los resultados demostraron que ambas proteínas son capaces de interactuar. Esto se observa en el segundo carril correspondiente al pull down con GST y la interacción fue específica puesto que no se observó en el control negativo, en donde se transfectó solamente GST (carril 1 del pull down), mismo que no es capaz de interactuar con Z6, el fragmento de unión proveniente de la subunidad reguladora de la PKA, como se muestra en la siguiente figura:

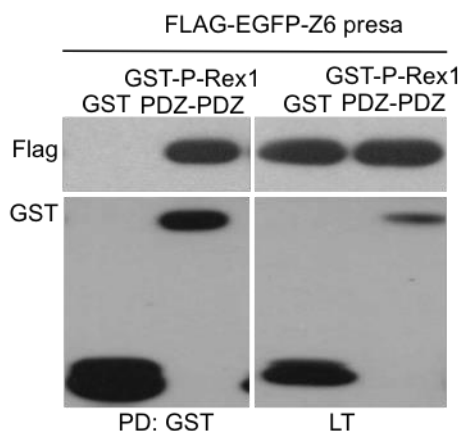


Figura 57. Interacción de Z6 y GST-P-Rex1-PDZ-PDZ en células HEK293T.

Una vez confirmada la interacción, se investigó si la asociación seguía manteniéndose cuando se transfectan los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 ahora con la proteína completa correspondiente a la subunidad reguladora tipo 1 alfa de la PKA, PRKAR1a. Para ello se co-transfectaron los plásmidos pCEFL-GST-PDZ-PDZ-P-Rex1 y pEGFP-C1-PRKAR1a en células 293T y 48 horas después se colectaron los lisados celulares y se hizo un pull down utilizando perlas de glutatión sefarosa para aislar los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 y mediante el anticuerpo contra EGFP se buscó la interacción con la proteína PRKAR1a. El

siguiente western blot muestra en la parte correspondiente al pull down que efectivamente existe una asociación específica entre los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 y la subunidad reguladora PRKAR1a.

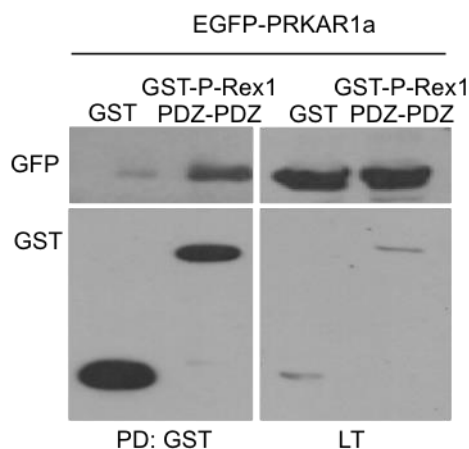


Figura 58. Interacción de EGFP-PRKAR1a con GST-P-Rex1-PDZ-PDZ en células HEK293T.

Posteriormente se probó la posibilidad de que las proteínas completas correspondientes a P-Rex1 y PRKAR1a pudieran asociarse, así que se transfectaron células 293T con el GEF P-Rex1 fusionado al epítipo HA y por otro lado a PRKAR1a unido a EGFP y 48h después de su transfección se obtuvieron los lisados y se inmunoprecipitó por afinidad a P-Rex1 incubando por 12-16h los lisados con el anticuerpo HA e incubándolos posteriormente con esferas de proteína G agarosa durante 3h. Se corrieron las muestras en SDS-PAGE al 10% y se hizo el western blot. Los resultados mostraron que P-Rex1 y PRKAR1a son capaces de asociarse como se observa en la siguiente figura en la parte izquierda correspondiente a la inmunoprecipitación en donde se ve que P-Rex1 fue inmunoprecipitado y detectado mediante el anticuerpo HA, además en el mismo carril por debajo de P-Rex1 y con un peso aproximado de 50 kDa también se detecta una banda correspondiente a PRKAR1a mediante el anticuerpo GFP lo que evidencia la asociación entre ambas proteínas.

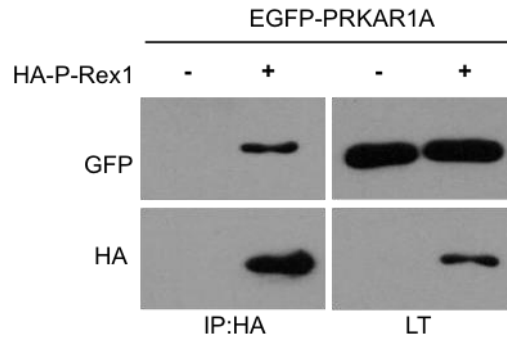


Figura 59. Interacción de EGFP-PRKAR1a con HA-P-Rex1 en células HEK293T.

La siguiente pregunta a resolver fue si solamente los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 eran capaces de interactuar con la presa Z6 encontrada en el doble híbrido, o si otros dominios del GEF también pudieran estar participando en la interacción con Z6. Para ello se mapeó a P-Rex1 para ver qué sitios estaban participando en la interacción. Se transfectaron células 293T con la presa Z6 junto con los diferentes dominios correspondientes a P-Rex1 fusionado a GST en su extremo amino: GST-DH-PH, GST-DEP-DEP, GST-PDZ-PDZ, GST-Cter y como control negativo GST. Se dejaron pasar 48h y se colectaron los lisados celulares, se hizo el pull down con esferas de glutatión sefarosa para aislar a las proteínas fusionadas a GST y posteriormente se corrieron las muestras en SDS-PAGE al 10% y se hizo el western blot. Para detectar las posibles asociaciones de Z6 con los diferentes dominios de P-Rex1, así como para probar su transfección se utilizó el anticuerpo contra GFP, mientras que para probar la efectividad del pull down se utilizó el anticuerpo contra GST. Así, se puede observar en la siguiente imagen que la asociación entre el GEF P-Rex1 y la subunidad reguladora PRKAR1a se da principalmente con los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1, aunque también se puede ver, aunque más débilmente, una asociación a través de los dominios DH-PH del GEF.

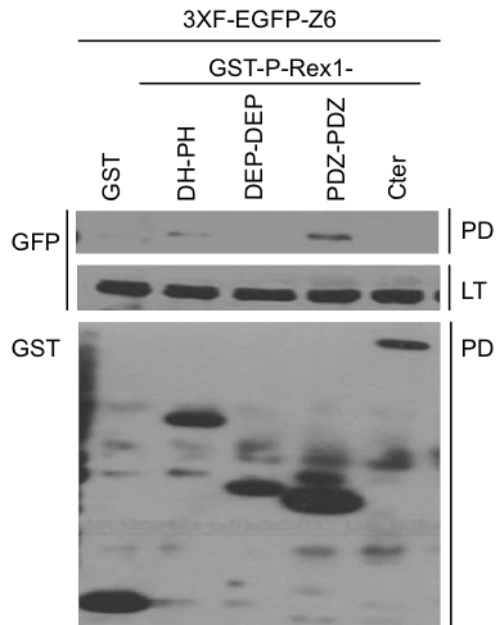


Figura 60. Mapeo de P-Rex1 en la interacción con 3XF-EGFP-Z6.

Asimismo, se realizó otro mapeo con los diferentes dominios de P-Rex1 evaluando en esta ocasión la asociación con la proteína completa de la subunidad PRKAR1a. Nuevamente se transfectaron células 293T con los diferentes dominios de P-Rex1 fusionados a GST: DH-PH, DEP-DEP, PDZ-PDZ, Cter y GST sólo como control negativo y en todos los casos co-transfectada la subunidad PRKAR1a fusionada a EGFP. Después de 48 horas de transfección se obtuvieron los lisados totales y se hizo el pull down utilizando las perlas de glutatión sefarosa para aislar a las proteínas fusionadas a GST. Se analizaron las muestras en un gel SDS-PAGE al 10% y se hizo después el western blot. Para detectar la asociación de PRKAR1a con los diferentes dominios de P-Rex1 se incubó la membrana con el anticuerpo para EGFP mientras que para verificar el éxito del pull down se utilizó el anticuerpo que reconoce a GST, de esta manera se obtuvieron los resultados que se muestran en la siguiente imagen:

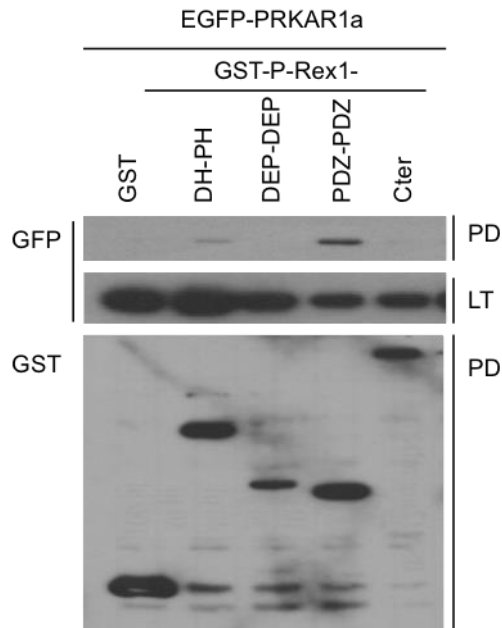


Figura 61. Mapeo de P-Rex1 en la interacción con EGFP-PRKAR1a.

Como se puede observar en el gel de arriba, los resultados fueron similares a los obtenidos en el mapeo anterior en donde se evaluó la asociación con Z6 y coincidiendo en este caso en una interacción de menor intensidad con los dominios DH-PH de P-Rex1 y confirmándose que la interacción entre el GEF P-Rex1 y PRKAR1a se lleva a cabo principalmente a través de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1, esto al menos en condiciones donde las células se encuentran en medio completo, es decir, suplementado con SFB al 10%.

Los resultados de los mapeos realizados, además de la propia estructura o conformación de P-Rex1 integrado por diferentes dominios, hace interesante el estudio y caracterización de la interacción puesto que cada uno de los dominios del GEF podría estar determinando o ejerciendo algún tipo de regulación con la subunidad reguladora PRKAR1a o de lo contrario, ser regulado por PKA en dependencia del tipo de estímulo recibido y el papel de los diferentes dominios de P-Rex1 frente a determinados estímulos.

Por la importancia y el papel que juega PKA en diversos procesos, entre ellos los que son de particular interés a nuestro laboratorio, procesos relacionados a la angiogénesis, específicamente en eventos de migración celular con los que se encuentra relacionada la cinasa PKA, otra de las preguntas que se plantearon fue la posibilidad de la interacción de P-

Rex1 con otra de las subunidades que conforman a PKA, precisamente con la subunidad catalítica 1 alfa quien finalmente se encarga de ejercer las fosforilaciones sobre las diferentes proteínas blanco de PKA, de tal manera que se planteó el siguiente experimento para evaluar la asociación con P-Rex1.

Se transfectaron células 293T con los plásmidos pCEFL-GST-PDZ-PDZ y pEGFP-C1-hPRKACa que codifican para los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 y la subunidad catalítica 1 alfa de PKA respectivamente, dejando como controles negativos a células transfectadas solamente con pCEFL-GST y otras además de GST, transfectadas con la subunidad catalítica pero no con los dominios PDZ de P-Rex1. Se siguió el mismo protocolo de recolección de lisados celulares a las 48h. Se hizo el pull down con perlas de glutatión sefarosa para precipitar y aislar a los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 a través de GST, para posteriormente correr las muestras en un gel SDS-PAGE al 10% y transferir las proteínas a membrana inmobilizada para evaluar la asociación de la subunidad catalítica hPRKACa con los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1, incubando la membrana con el anticuerpo que reconoce a EGFP. Como se observa en la imagen de abajo, en el segundo carril que corresponde al pull down (PD) en donde se encuentran precisamente las dos proteínas transfectadas, GST-PDZ-PDZ-P-Rex1 y EGFP-C1-hPRKACa, el anticuerpo EGFP reconoce a la banda que corresponde a la subunidad catalítica PRKACa de PKA lo que indica la asociación con los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1. Puesto que en los carriles uno y tres del PD (controles negativos) no se detectan bandas, esto indica que, así como hay una interacción específica de P-Rex1 a través de los dominios PDZ-PDZ con PRKAR1a, también ocurre una asociación específica con la subunidad catalítica de la PKA, PRKACa.

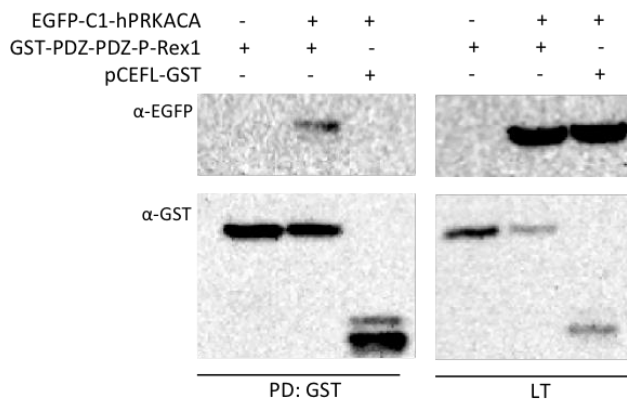


Figura 62. Interacción de los dominios PDZ-PDZ de P-Rex1 con EGFP-C1-hPRKACA.

Los resultados anteriores indican que la asociación entre el GEF P-Rex1 con la cinasa PKA puede formarse a través de la subunidad reguladora PRKAR1a, y que la subunidad catalítica PRKACa de la cinasa PKA puede formar parte del complejo. Este hecho hace aún más interesante la caracterización de la interacción entre el GEF P-Rex1 y la cinasa PKA, ya que sustenta la hipótesis de que pudiera haber una regulación recíproca de la PKA a P-Rex1 y viceversa, dependiente de la activación de cascadas de señalización que active a uno u otro de estos efectores. El efecto, desde luego, dependerá en gran medida de los estímulos recibidos, como éstos son canalizados intracelularmente, así como de la proteína que sea activada en primera instancia.

Considerando la posible importancia de este nuevo nodo de regulación en la señalización quimiotáctica que involucra a P-Rex1 y a la cinasa PKA decidimos investigar si la interacción caracterizada con proteínas transfectadas ocurría en un contexto en que estas se expresan de forma endógena. Así pues, para confirmar la interacción entre P-Rex1 y la proteína cinasa A que involucra a proteínas endógenas hicimos un ensayo en células COS-7 en donde se inmunoprecipitó a la subunidad reguladora de PKA (R1a) y se buscó la asociación con P-Rex1 utilizando anticuerpos contra este GEF. De esta manera se demostró que la subunidad reguladora R1a endógena interacciona con el GEF P-Rex1 endógeno. Esto comprueba la interacción endógena entre ambas proteínas, misma que ocurre de manera específica ya que en el control negativo no se detectó P-Rex1 que hubiera podido inmunoprecipitarse inespecíficamente. Estos resultados ^{*1} se muestran en la siguiente figura:

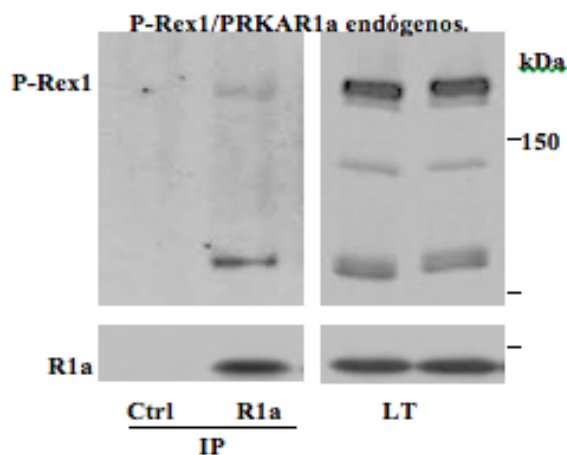


Figura 63. Interacción endógena entre P-Rex1 y la subunidad reguladora R1a de PKA ^{*1}.

Una vez confirmada la interacción de P-Rex1 con PKA de manera endógena surgió la necesidad de ahondar en la dinámica de la interacción y responder a las preguntas acerca de los efectos que un determinado estímulo, en este caso, SDF-1 pudieran tener sobre la interacción P-Rex1 con PKA. Así que primero se hicieron experimentos para determinar la cinética de activación de P-Rex1. Células COS-7 transfectadas con Flag-P-Rex1 se ayunaron a las 48h post-transfección y se estimularon a diferentes tiempos con SDF-1 (50 ng/mL). La fracción activa de P-Rex1 se obtuvo mediante la interacción con una GTPasa libre de nucleótido. Esto es, a través de un pull down con GST-Rac G15A y detectando por western blot a P-Rex1 con el anticuerpo Flag. Los resultados^{*1} obtenidos muestran que P-Rex1 puede ser activado por SDF-1 a partir del minuto 1, con un pico máximo de activación al minuto 30, tal como se ve en la figura 64:

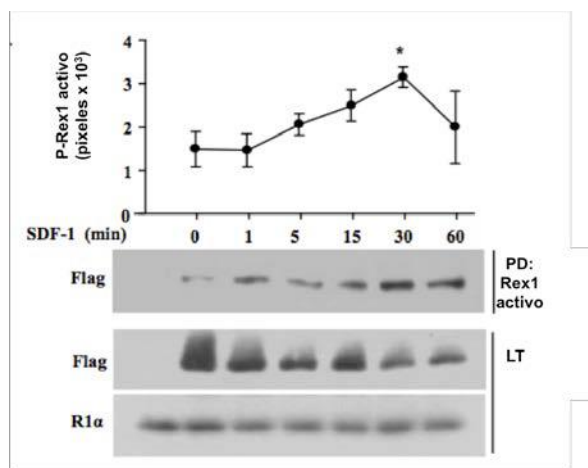


Figura 64. Cinética de activación de P-Rex1 en células COS-7 estimuladas con SDF-1^{*1}.

Posteriormente se evaluó el efecto de SDF-1 en la interacción de P-Rex1 con PRKAR1a. Para ello se co-transfectaron células 293T con los plásmidos pEGFP-PRKAR1a y pCEFL-3XFlag-P-Rex1. Después de 36h las células se ayunaron por 12h y posteriormente se estimularon con SDF-1 a una concentración de 100ng/ml a diferentes tiempos: 0, 1, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos. Después se colectaron los lisados celulares y se inmunoprecipitó a 3XF-P-Rex1 incubando con anti-Flag durante la noche. Posteriormente se incubaron las muestras con perlas de Proteína G agarosa por 3h. Se analizaron las muestras en SDS-PAGE al 10%, se transfirieron en membrana immobilon y se hizo el western blot. Se incubó con anti-EGFP para

detectar a la subunidad reguladora PRKAR1a y ver el efecto de SDF-1 sobre la interacción con P-Rex1. La siguiente imagen del curso temporal muestra que, en efecto, la interacción entre P-Rex1 y PRKAR1a es modulada por SDF-1 observándose que la interacción se refuerza a los minutos 10 y 20 de estimulación (WB anti EGFP en la membrana correspondiente a la inmunoprecipitación). Como control, se confirmó el efecto esperado del estímulo SDF-1 sobre la activación de la vía de las MAP cinasas, evidenciado mediante el anticuerpo que reconoce a la forma fosforilada de MAPK42/44. Esto se observa en el blot con anti pMAPk42/44 en donde la activación de MAP cinasas sucedió desde el minuto 1 y teniendo un pico máximo de activación a los 5 minutos.

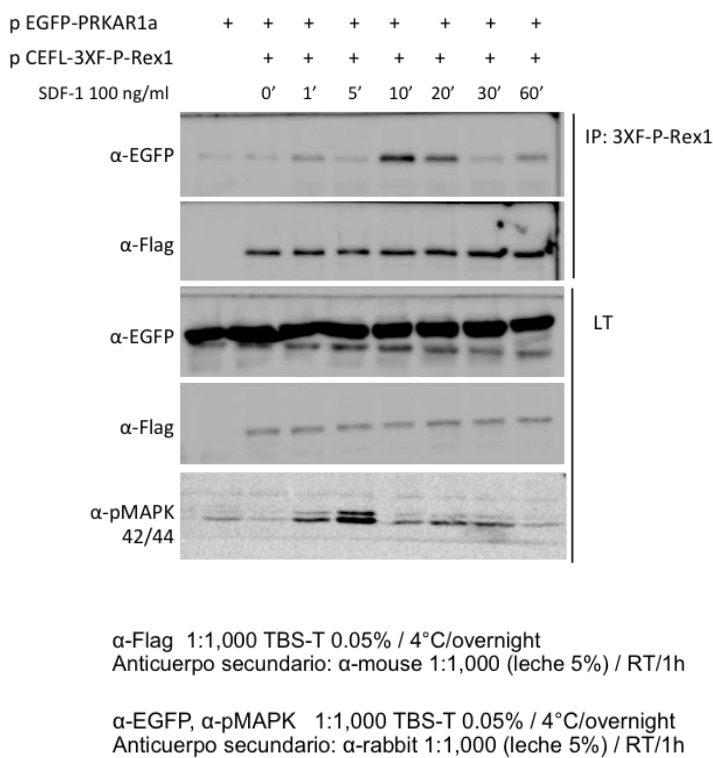


Figura 65. Efecto de SDF-1 en la interacción de PRKAR1a con P-Rex1.

El efecto de SDF-1 en la asociación de P-Rex1 con PRKAR1a endógena se evaluó en células COS-7 transfectadas con la construcción correspondiente al amino terminal de P-Rex1 fusionada a GST (GST-P-Rex1-DH-PH-DEP1-DEP2-PDZ1-PDZ2). Las células fueron ayunadas a las 48h y estimuladas con SDF-1 a diferentes tiempos. Se hizo un pull down con GST y se buscó la asociación del fragmento correspondiente a P-Rex1 con la subunidad reguladora endógena de PKA a través del anticuerpo anti-R1α. Los resultados^{*1} mostrados

en el siguiente western blot indican que la asociación entre estas dos proteínas es reforzada cuando las células se estimulan con SDF-1:

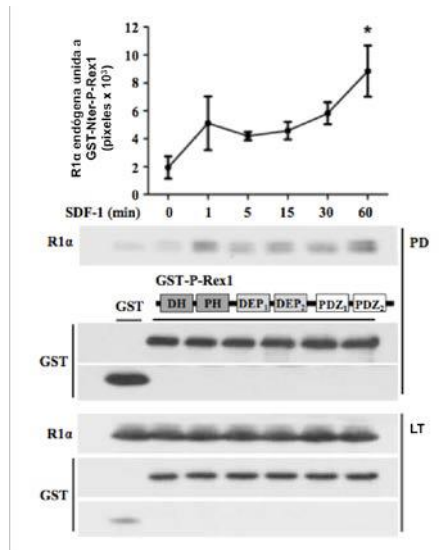


Figura 66. Asociación de PRKAR1a con GST-Nter-P-Rex1. *1.

Los experimentos anteriores muestran que la asociación entre P-Rex1 y PRKAR1a se refuerza bajo el estímulo de SDF-1, tanto en células 293T como en las COS-7. A esto le siguieron experimentos para visualizar la asociación y la dinámica de ambas proteínas bajo el estímulo SDF-1. Se utilizaron células COS-7 por su alta eficiencia de transfección, además de ser células de tamaño grande, característica que se aprovechó para los análisis de microscopía.

Se evaluaron las células COS-7 frente al estímulo SDF-1 y se hizo un curso temporal de cero, uno, cinco, quince, treinta y sesenta minutos para probar la respuesta de las células en relación a la activación de las cascadas de las MAP cinasas y la fosforilación de AKT.

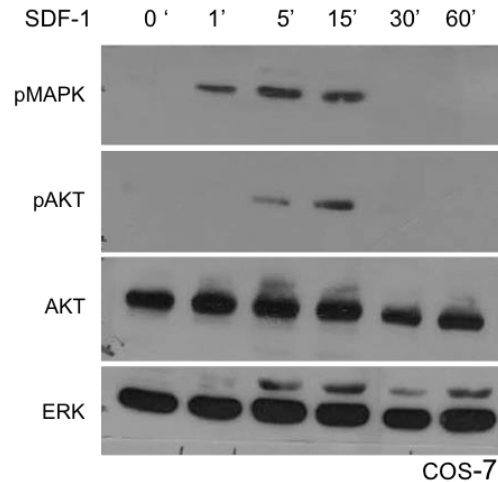


Figura 67. Efecto de SDF-1 en la activación MAPK y AKT en células COS-7.

La anterior imagen confirma que efectivamente las células COS-7 son capaces de responder a SDF-1 y esta activación en relación a la vía de fosfo MAPK se da desde el minuto 1 hasta el minuto 15 de estimulación. De acuerdo a estos tiempos, se realizaron los experimentos de microscopía para los análisis de la dinámica celular en la asociación de P-Rex1 con la subunidad reguladora PRKAR1a. En cajas p35 con fondo de vidrio recubiertas con gelatina al 0.02%, fueron sembradas células COS-7 considerando tener una densidad de confluencia baja. Posteriormente se transfectaron con los plásmidos pEGFP-C1-P-Rex1 y pmCherry- PRKAR1a y se mantuvieron con DMEM suplementado con SFB al 10%. Después de 24 horas las células fueron ayunadas durante toda la noche. Al día siguiente éstas fueron estimuladas con SDF-1 durante 1, 5 y 15 minutos, de acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento anterior en los que se observó la activación de la cascada de las MAP cinasas. Posterior al estímulo recibido, las células fueron fijadas con paraformaldehído y observadas en el microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse Ti, utilizando el objetivo de inmersión Plan Apo VC 1.4. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Nikon DS-Qi1Mc y fueron obtenidas utilizando los filtros Texas Red para visualizar a PRKAR1a y GFP para P-Rex1. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a células que fueron estimuladas durante 5 minutos, condición en la que cambios dependientes de SDF-1 fueron evidentes. En la siguiente figura se puede observar la distribución celular de P-Rex1 y PRKAR1a de manera basal, así como el efecto que el SDF-1 tiene sobre su localización bajo tres situaciones: 1) células transfectadas solamente con EGFP-P-Rex1, panel a y c, 2)

células transfectadas solamente con la subunidad reguladora PRKAR1a marcada con mCherry, panel b y d y 3) células transfectadas con ambas proteínas a la vez EGFP-P-Rex1 y mCherry- PRKAR1a, panel e, f, g, h, i, j. Los resultados obtenidos mostraron que en estado basal P-Rex1 y PRKAR1a se encuentran distribuidos de manera citosólica (panel a, b, e y f), mientras que las células estimuladas con SDF-1 y que expresan de manera independiente a P-Rex1 muestran que una fracción del GEF es reclutada a la membrana celular (panel c), efecto que no sucede para la subunidad reguladora PRKAR1a, misma que permanece citosólica aún en células estimuladas con SDF-1 (panel d). En el caso donde las células expresan a ambas proteínas y además son estimuladas con SDF-1 se puede ver claramente que en estas condiciones P-Rex1 sigue traslocándose a la membrana celular (panel g) y, de manera particularmente interesante, la subunidad reguladora PRKAR1a también se re-localiza en la membrana celular (panel h) hecho que se puede observar claramente en el traslape de las imágenes mostradas en g y h (panel i) y además en la ampliación del panel anterior (panel j).

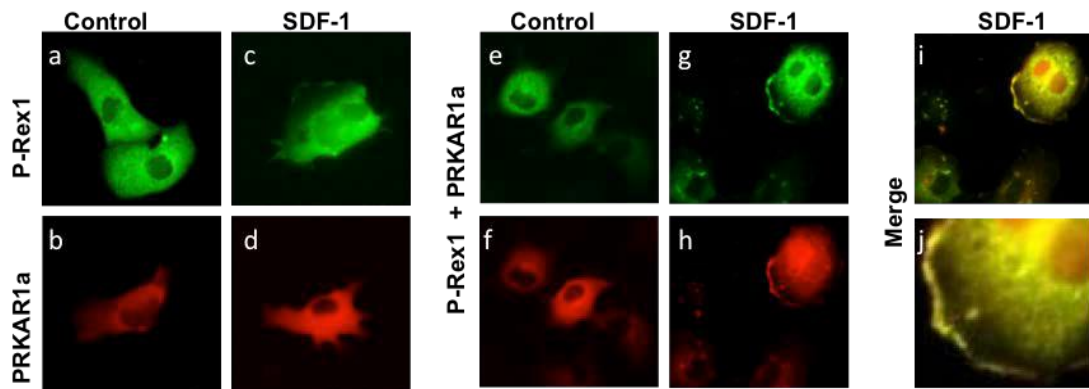


Figura 68. PRKAR1a es reclutada a membrana celular de manera dependiente de P-Rex1 en células COS-7 estimuladas con SDF-1.

Estos resultados muestran que PRKAR1a es reclutada a membrana celular de manera dependiente de P-Rex1 bajo el estímulo SDF-1. Efectos similares se observaron en la línea celular HMEC (human microvascular endothelial cells) transfectadas con EGFP-P-Rex1 y mCherry-PRKAR1a estimuladas con SDF-1:

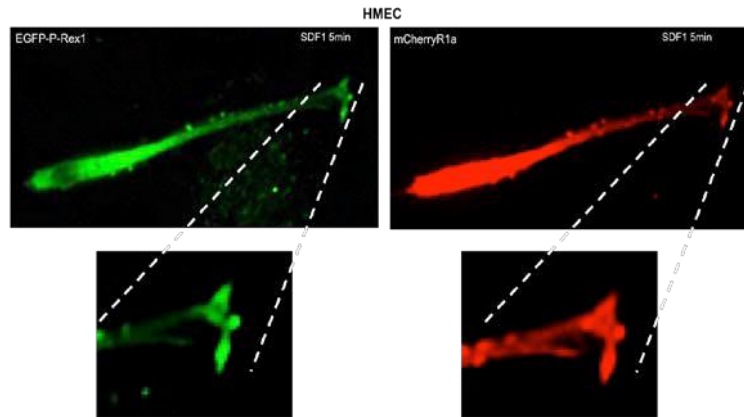


Figura 69. Reclutamiento a membrana celular de PRKAR1a dependiente de P-Rex1 en células HMEC estimuladas con SDF-1.

y en las células HUVEC, que también se usaron para analizar esta dinámica. Se hizo primero una curva temporal para ver la respuesta de las células estimuladas con SDF-1 y se analizó la activación de las vías MAP cinasas y Akt, observando un aumento de su activación a partir del primer minuto con un pico al minuto 5 como se muestra en el siguiente blot:

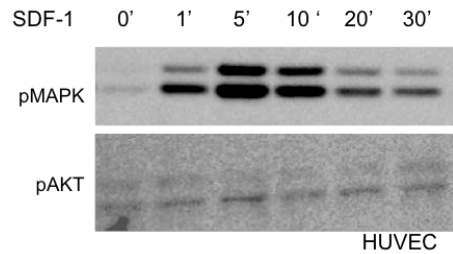


Figura 70. Activación de MAPK y AKT en células HUVEC estimuladas con SDF-1.

Asimismo en células HUVEC infectadas con el biosensor para Rac (Raichu X115Rac) se evaluó el efecto de SDF-1 en la activación de la GTPasa Rac, esto se hizo por microscopía de fluorescencia con la técnica FRET (fluorescence resonance energy transfer) que ofrece la oportunidad de explorar *in vivo* cambios de conformación, separación o asociación de moléculas, en este caso, la activación de Rac por el intercambio de GDP a GTP promovido por un efector. A continuación se muestran imágenes obtenidas a partir de un experimento de time-lapse en donde la activación espacio-temporal de Rac corresponde a las áreas en color

rojo.

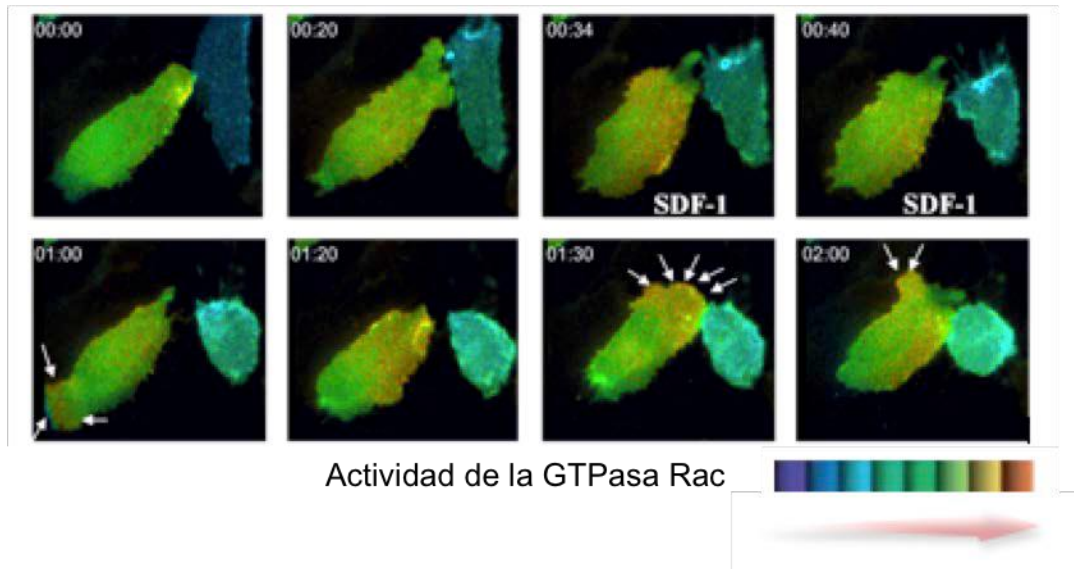


Figura 71. Activación espaciotemporal de Rac en células HUVEC infectadas con el biosensor Raichu X115Rac.

Se comenzó el estímulo de las células con SDF-1 a partir del minuto 00:34 provocando la activación espacio-temporal de Rac como se observa en los paneles subsecuentes a la estimulación. Este efecto se detectó en áreas cercanas a la membrana celular como se señala al tiempo de 01:00, 01:30 y 02:00 horas en donde las zonas señaladas con las flechas y en rojo corresponden a la activación de la GTPasa Rac. Con los resultados anteriores, se verificó que las células HUVEC responden a SDF-1. Esto sirvió de base para pruebas en esta línea celular tendientes a visualizar la localización de P-Rex1 y PRKAR1a bajo el efecto del estímulo. Tanto EGFP-P-Rex1 como mCherry-PRKAR1a fueron transfectados en las células HUVEC. Veinticuatro horas después, las células mantenidas en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. Por otro parte, se ayunaron otras células durante 2h y posteriormente se estimularon con 100ng/mL de SDF-1. La localización de P-Rex1 y PRKAR1a fue similar tanto en las células COS7 como en las HMEC. En las células mantenidas en DMEM suplementado con SFB 10%, así como también en las estimuladas con SDF-1, se observó una clara localización de P-Rex1 (verde) y PRKAR1a (rojo) en la membrana celular.

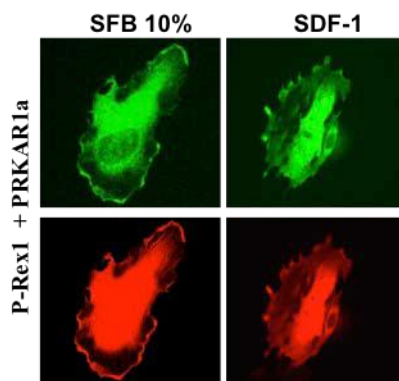


Figura 72. Colocalización en membrana celular de P-Rex1 y PRKAR1a en HUVEC estimuladas con SFB 10% y SDF-1.

Los resultados anteriores muestran el claro efecto de SDF-1 en el reclutamiento de P-Rex1 a la membrana celular, de igual manera que lo hace PRKAR1a, solo que esta última lo hace de una manera dependiente de la presencia de P-Rex1. Así se pone de manifiesto la existencia de una dinámica espacio-temporal en la asociación de P-Rex1 con PRKAR1a que es favorecida por SDF-1, hecho que resulta importante ya que concuerda con el planteamiento de que P-Rex1 se encuentra asociado con su regulador, la proteína cinasa A. Estos hallazgos apoyan la posibilidad de una modulación por parte de PKA sobre P-Rex1 y viceversa, además de que este último localiza a la PKA en sitios subcelulares específicos, en este caso, en la membrana celular, en espera de una señal activante que pueda ejercer sus efectos sobre P-Rex1 o algún otro posible sustrato ubicado en dicho entorno.

Posterior a los resultados de la dinámica celular de P-Rex1 y PRKAR1a en respuesta al estímulo con SDF-1 que sugieren la existencia de un mecanismo de regulación del GEF P-Rex1 por parte de la cinasa PKA, de acuerdo a la co-localización celular que presentan el GEF y la subunidad reguladora de la PKA, además del reclutamiento a la membrana celular de la subunidad reguladora PRKAR1a dependiente de P-Rex1. Considerando estas posibilidades, se evaluó la participación de PRKAR1a en procesos de migración celular en los que se ha descrito la importancia de P-Rex1. Para ello se hicieron experimentos de cierre de herida. Se transfectaron células COS-7 con los cDNAs que codifican para la subunidad PRKAR1a o el shRNA específico para bloquear la expresión de la subunidad PRKAR1a y, cuando se encontraban al 100% de confluencia, se hizo una herida para estudiar el movimiento celular sobre el cierre de herida promovido

por SDF-1. Se monitorearon las células durante 48 horas. Se capturaron imágenes a 0, 12, 24 y 48 horas de las diferentes condiciones: células control, células expresando a PRKAR1a y células transfectadas con shRNA-PRKAR1a. Al término de las 48 horas se comparó el cierre de herida entre las tres condiciones y se observó una diferencia importante entre las células transfectadas con shRNA-PRKAR1a de las control o que expresaban a la subunidad PRKAR1a. Estos resultados se muestran en la siguiente figura en la que el área monitoreada se marcó en color rojo para una mejor visualización.

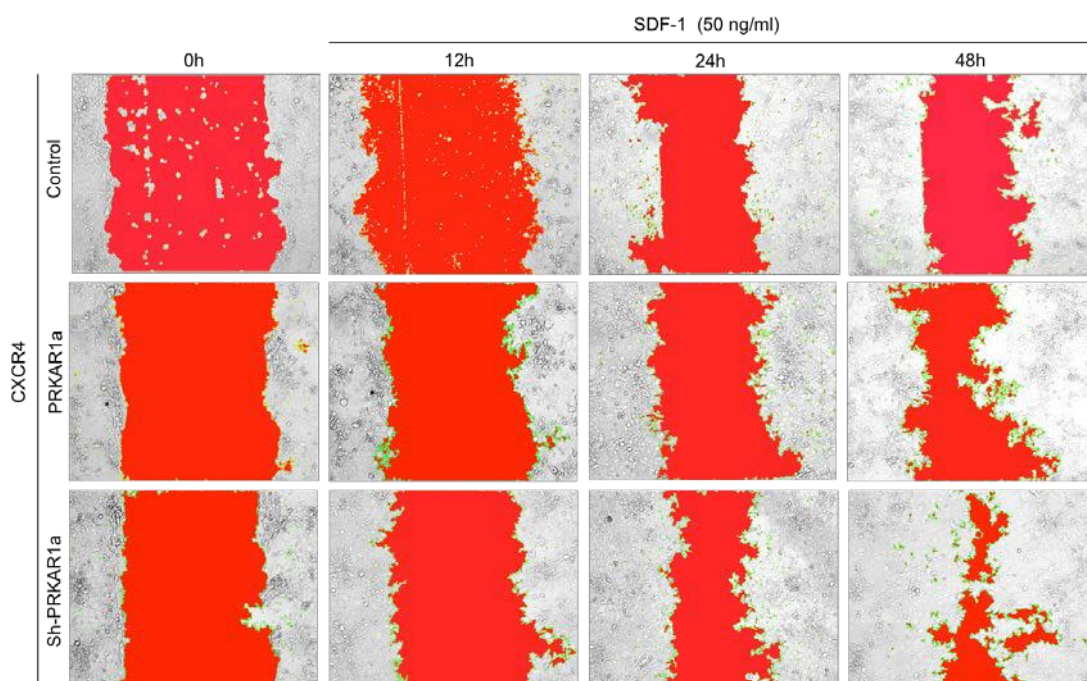


Figura 73. Cierre de herida de células COS-7 transfectadas con el receptor CXCR4 y estimuladas con SDF-1 sobreexpresando o bloqueando a PRKAR1a.

El inhibir a PRKAR1a mediante shRNA permitió un avance celular y cierre de herida mayor que cuando PRKAR1a se encontraba sobreexpresada, lo que sugiere una modulación negativa por parte de PRKAR1a en eventos migratorios.

Por otra parte, se realizaron experimentos para investigar la participación de PRKAR1a sobre la regulación de P-Rex1 en quimiotaxis de células endoteliales PAE estimuladas con S1P. La finalidad fue evaluar la importancia de la PRKAR1a en la propia regulación del GEF, particularmente considerando la interacción de los dominios PDZ1-PDZ2 de P-Rex1

con la región carboxilo terminal de la subunidad reguladora de la PKA, denominada por nosotros Z6 (por corresponder a la sexta clona aislada con los dominios PDZ). Así, células PAE se transfectaron con 3XF-EGFP-Z6 y con el control EGFP-CAAX y fueron sometidas al ensayo de migración en cámara de Boyden. El quimioatrayente que se utilizó fue S1P. Después de 6 h se evaluaron las células que lograron migrar en respuesta al estímulo y esto se hizo a través de microscopía comparando las células control con las células transfectadas con Z6, tanto en estado basal como las estimuladas con S1P. Los resultados^{*2} obtenidos muestran que la presencia de Z6 facilita la migración celular, tanto en el estado basal como en respuesta a S1P. Este efecto se exagera cuando las células son estimuladas con S1P a concentraciones de 0.01 y 0.1 μM , como se observa en la figura siguiente:

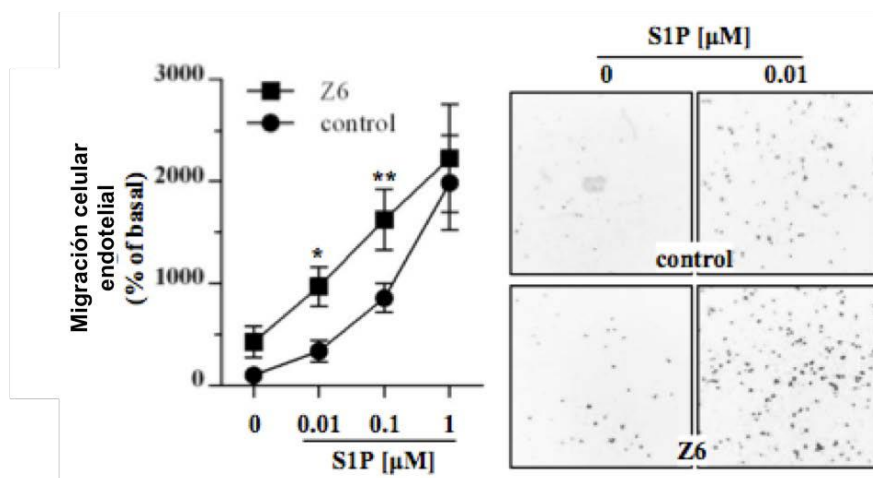


Figura 74. Efecto positivo de Z6 en migración de células PAE estimuladas con S1P ^{*2}.

También se hicieron experimentos de migración celular polarizada utilizando células COS-7, teniendo células control no transfectadas y otras transfectadas con el shRNA-PRKAR1a. Después de 48 horas, las células se ayunaron durante toda la noche y al cumplir 72 horas después de la transfección se usaron para los experimentos de migración y una fracción fue lisada. Se siguió el protocolo del ensayo de migración, utilizando como estímulo a SDF-1 a una concentración de 50 ng/ml. La migración celular se analizó 6 horas después del estímulo. Los resultados obtenidos de este ensayo confirmaron que la ausencia de la subunidad reguladora PRKAR1a facilita la migración de las células COS-7 hacia el quimioatrayente SDF-

1 como se muestra en la siguiente figura:

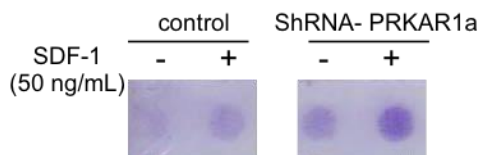


Figura 75. Ensayo de quimiotaxis en cámara de Boyden de células COS-7 en condiciones basales con SDF-1. Efecto del shRNA-PRKAR1a en la migración celular.

Nuevamente se observa que las células en las que no está presente la subunidad reguladora PRKAR1a por efecto de su bloqueo con el shRNA-PRKAR1a, las células migran con mayor eficiencia hacia el medio con el estímulo SDF-1 en comparación con las células control, lo que evidencia la participación de PRKAR1a, en este caso, regulando de manera negativa el procesos de migración de las células COS-7 promovidos por SDF-1.

Una vez confirmada la regulación que PRKAR1a ejerce en migración celular dependiente de P-Rex1, surgió la necesidad de investigar el efecto de PKA sobre la actividad de P-Rex1, así como en eventos de migración en los que participa. Primero se determinó el efecto de la activación de PKA mediante FSK (utilizando al mismo tiempo el inhibidor de fosfodiesterasas, IBMX) sobre la activación de P-Rex1. Para ello se transfectaron células COS-7 con Flag-P-Rex1 y con la GTPasa libre de nucleótido GST- Rac-G15A. Los lisados celulares obtenidos se trataron con SDF-1, FSK/IBMX o con ambos estímulos. La activación de P-Rex1 se midió*¹ mediante el pull down con GST y detectando con anti-Flag al GEF y por otra parte se comprobó la activación de PKA mediante la fosforilación de CREB como se muestra en la figura 76:

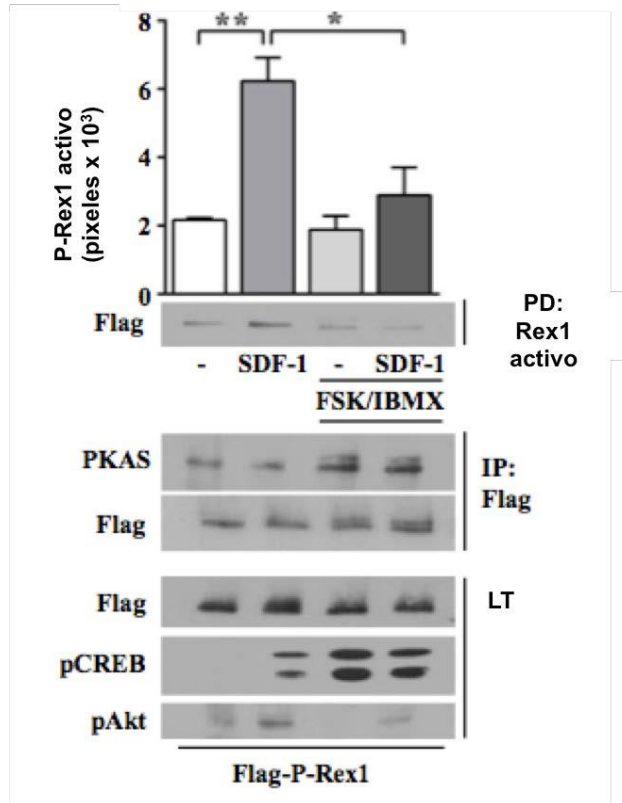


Figura 76. Efecto de la activación de PKA sobre P-Rex1 en células COS-7 estimuladas con SDF-1^{*1}.

Como se observa en los resultados anteriores, la activación de P-Rex1 dependiente de SDF-1 es inhibida por el efecto de la activación de PKA con FSK/IBMX. Más aún, esta activación de PKA promueve la fosforilación de P-Rex1, hecho que fue demostrado al inmunoprecipitar a P-Rex1 con anti-Flag y detectando sustratos fosforilados de PKA a través del anticuerpo que los reconoce, anti-PKAS. Del efecto inhibitorio observado de PKA sobre la actividad de P-Rex1 surgió la necesidad de averiguar sus consecuencias funcionales, así que se evaluó el efecto de PKA en la migración de células PAE. En este caso las células fueron estimuladas con S1P y pre-incubadas con FSK/IBMX o FSK/IBMX/H89. Los resultados^{*2} obtenidos después de 6h de migración en cámara de Boyden revelaron que la activación de PKA inhibe la migración de células estimuladas con S1P, pre-incubadas con el activador de PKA y el inhibidor de fosfodiesterasas (FSK/IBMX) y que ésta es parcialmente recuperada al utilizar H89, un inhibidor de la PKA, tal como se muestra en la figura 77:

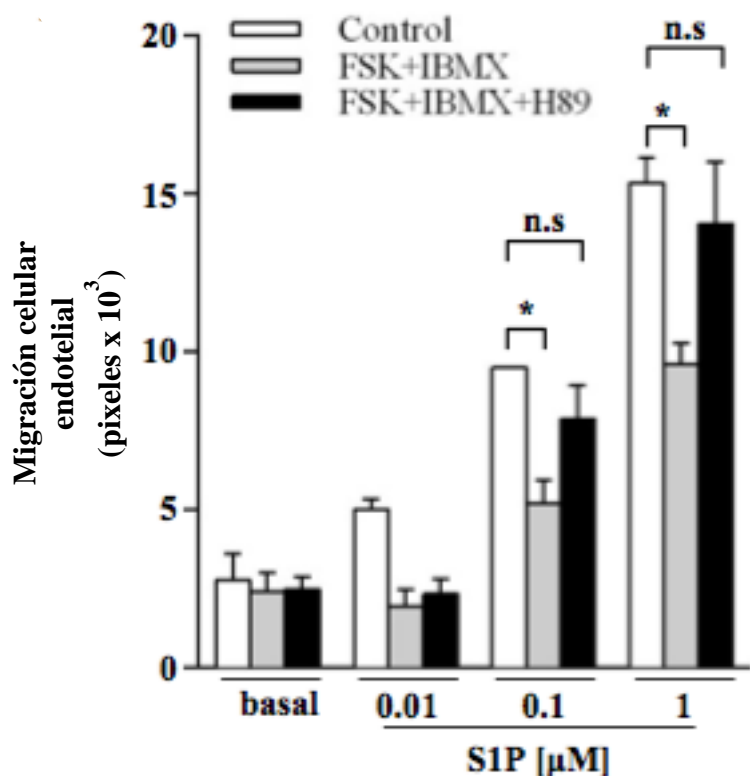


Figura 77. Efecto de la activación de PKA en la migración de células PAE estimuladas con S1P ^{*2}.

Finalmente, para investigar si la migración celular inhibida por PKA en células estimuladas con S1P tiene correlación con el hecho anteriormente observado de que P-Rex1 es regulado por PKA de manera negativa, se llevaron a cabo nuevos experimentos de quimiotaxis en cámara de Boyden para evaluar la migración de células PAE bajo el estímulo de S1P (0.1 μM), pre-incubadas o no con FSK/IBMX y comparando dos variables,

1) células transfectadas con la región amino terminal de P-Rex1, construcción WT, Nter- P-Rex1-CAAX y 2) células transfectadas con una mutante no fosforilable por PKA de la región correspondiente al amino terminal de P-Rex1, Nter-P-Rex1-Ser436A-CAAX. Esto en base a los hallazgos obtenidos en nuestro laboratorio (Tesis de Maestría de Sendi Rafael Adame García) en donde se demuestra que la PKA fosforila a P-Rex1 en la serina 436 (S436) que se encuentra en el dominio DEP1 de P-Rex1. Los resultados^{*2} obtenidos confirman que la migración de las células PAE estimuladas con S1P es inhibida por la activación de PKA y esta inhibición está relacionada con el hecho de que P-Rex1 WT está sujeto a fosforilación por parte de PKA, regulándolo de manera negativa. Así pues, la PKA ejerce

efectos negativos sobre la migración celular al inhibir a P-Rex1, no así en el caso en donde se encuentra la mutante no fosforilable de P-Rex1, Nter-P-Rex1-Ser436A-CAAX que impide su fosforilación aún en las condiciones en donde PKA está activa. Esto sugiere que el efecto inhibitorio que la PKA ejerce sobre P-Rex1 es fosforilándolo. Los resultados se muestran en la siguiente figura:

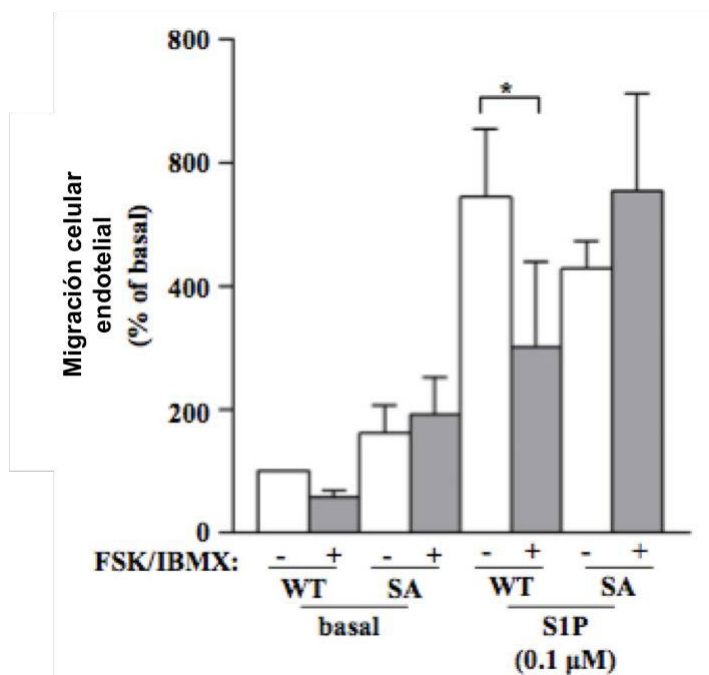


Figura 78. Efecto inhibitorio de PKA en la migración de células PAE estimuladas con S1P en correlación a la fosforilación de P-Rex1 ejercida por PKA ^{*2}.

NOTA:

*1. Experimentos desarrollados y resultados obtenidos con la participación del M. en C. Rodolfo Daniel Cervantes Villagrana.

*2. Experimentos desarrollados y resultados obtenidos con la participación del M. en C. Alejandro Castillo Kauil.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como se planteó desde un principio, el objetivo del presente trabajo fue investigar los aspectos moleculares de la interacción entre la proteína cinasa A y el GEF P-Rex1. Consideramos que revelar la importancia de esta asociación en los procesos de transducción de señales angiogénicas, así como conocer las cascadas de señalización y mecanismos que se llevan a cabo al interior de la célula, ofrece la oportunidad de encontrar blancos terapéuticos que permitan frenar el desarrollo de enfermedades como el cáncer, donde los procesos de migración celular tienen gran relevancia. El GEF para la GTPasa Rac, P-Rex1 y la cinasa PKA tienen un papel importante en eventos que involucran movimiento celular. P-Rex1 es una proteína multidominio que funciona como GEF que integrando señales extracelulares provenientes de receptores acoplados a proteína G, específicamente los receptores CXCR4 y se activa a través del heterodímero G $\beta\gamma$ y PIP3 desencadenando la activación de la GTPasa Rac (Welch et al., 2002, Carretero-Ortega et al., 2010). Por su parte, la PKA es una cinasa conformada por dos unidades reguladoras y dos catalíticas. Su activación depende del aumento de los niveles de AMP cíclico y, por tanto, esta vía es activada a través de Gas (Kim, Cheng, Saldanha, & Taylor, 2007). Así, la PKA ejerce acción sobre sus proteínas efectoras, regulándolas mediante fosforilaciones. En el presente trabajo, se lograron los objetivos marcados ya que se demostró que el GEF P-Rex1 se asocia a la PKA, esto en modelos de cultivo celular en donde se caracterizó la interacción. P-Rex1 se asocia a través de sus dominios PDZ con PRKAR1a, la subunidad reguladora de PKA, en la región que corresponde al segundo dominio de unión a AMPc (CNB B) en el carboxilo terminal. Esta asociación de P-Rex1 permanece cuando se trata del tetrámero PKA, que incluye a las subunidades reguladoras y catalíticas. Es importante resaltar que esta interacción también ocurre de manera endógena, esto en células COS-7. En esta misma línea celular también se demostró un punto importante que inicialmente se hipotetizaba respecto a la asociación entre P-Rex1 y la PKA, y es, que existe una regulación por parte del GEF sobre la cinasa, ya que cuando se encuentran presentes ambas proteínas y se da un estímulo con SDF-1, un quimioatrayente que activa a P-Rex1, parte de éste se re-localiza a la membrana celular, reclutando al mismo sitio a la subunidad reguladora PRKAR1a (Chávez-Vargas et al., 2016). Este reclutamiento de PRKAR1a a la membrana es dependiente de P-Rex1, ya que en su ausencia y bajo el estímulo de SDF-1, la PRKAR1a no presenta cambios en cuanto a su distribución, ya que permanece en el citosol. Aquí parece haber una regulación bidireccional en tanto que también el reclutamiento de P-Rex1 hacia

la membrana, dependiente de SDF-1 se ve aumentado cuando PRKAR1a se encuentra presente, esto en comparación cuando PRKAR1a no se encuentra transfectada en las células. Esta regulación de P-Rex1 en la localización de PRKAR1a a la membrana celular, dependiente de estímulo, también quedó demostrada en células endoteliales HMEC y HUVEC. En paralelo se demostró que P-Rex1 se activa dependiente del tiempo de estimulación con SDF-1, lo que también provoca que se refuerce la asociación con PRKAR1a. Como consecuencia funcional de esta interacción, sugerimos que la asociación de P-Rex1 con PRKAR1a facilita la regulación negativa que la cinasa PKA ejerce sobre el GEF. Esto además se fundamenta con los resultados obtenidos en ensayos de quimiotaxis, en los que se demostró en células PAE transfectadas con Z6 (que corresponde al segundo dominio de unión a AMPc en la subunidad reguladora PRKAR1a), que estas células, al ser estimuladas con S1P, migraban con mayor facilidad en comparación con las células control. Esto nos indica que la interacción de la PKA con P-Rex1 facilita la regulación de este GEF y que dicho efecto disminuye en presencia del fragmento de unión derivado de la PRKAR1a, debido a la competencia por el sitio de unión en P-Rex1 con PKA. De esta manera se explica cómo PKA se localiza junto a su proteína efectora P-Rex1, lo que le permite ejercer regulación sobre el GEF de manera precisa y eficiente. Por otra parte, experimentos en células COS-7 transfectadas con el receptor CXCR4 y, posteriormente, estimuladas con SDF-1, en donde se comparan células que sobreexpresan a PRKAR1a contra otras cuya expresión de la subunidad reguladora se bloqueó mediante la transfección del shRNA-PRKAR1a, ponen de manifiesto la participación de PRKAR1a en procesos de migración celular. El cierre de herida casi consumado de células en las que la expresión de PRKAR1a se bloqueó, en comparación con el cierre de herida menos efectivo de las células que sobreexpresaban a PRKAR1a sugería que la ausencia de la subunidad reguladora dificultaba la asociación entre P-Rex1 y PKA, en cuyo caso disminuirían las probabilidades de interacción entre ambas proteínas puesto que no coincidirían espacialmente en la célula evitando así su asociación y por consiguiente, la regulación de PKA sobre P-Rex1. Esto es, PKA no se encontraría cercana a su sustrato P-Rex1 y, por tanto, no estaría en posibilidad de regularlo. Por el contrario, en el caso de las células que sobreexpresan a PRKAR1a, la migración celular se vio desfavorecida. Estos resultados fueron apoyados por otros experimentos de quimiotaxis en los que las células transfectadas con el shRNA-PRKAR1a y estimuladas con SDF-1, igualmente mostraron una mayor migración celular en comparación con las células control, lo cual podría estar relacionado con el hecho de que PRKAR1a se asocia con P-Rex1 y que dicha asociación se refuerza de manera dependiente de SDF-1, facilitando así la

regulación negativa del GEF por parte de la PKA, inhibiendo su activación y, por tanto, inhibiendo la vía de señalización dependiente de P-Rex1 que activa a la GTPasa Rac promoviendo la migración celular.

Con el fin de conocer a detalle el mecanismo de regulación que la PKA ejerce sobre P-Rex1, en paralelo se investigó la existencia de sitios de fosforilación. Los resultados de tales análisis, que se describen a detalle en la tesis de Maestría de Sendi Rafael Adame García, revelaron que la PKA fosforila a P-Rex1 en el dominio DEP1, específicamente en la Serina 436 (Chávez-Vargas et al., 2016). Este hallazgo sugería una regulación directa de la PKA sobre P-Rex1, lo que llevó a buscar los mecanismos moleculares involucrados en dicha regulación. En el presente trabajo, se demostró que efectivamente, P-Rex1 es regulado por PKA. P-Rex1 es activado en respuesta a SDF-1, sin embargo, esta activación es bloqueada cuando se estimula a las células con FSK/IBMX promoviendo la activación de la vía de PKA y por tanto, la fosforilación de P-Rex1. Las pruebas funcionales de migración hechas en células PAE expresando la región amino terminal Wild Type (WT) de P-Rex1 o una mutante no fosforilable de P-Rex1 (SA) y que fueron estimuladas con S1P y pre-tratadas con FSK/IBMX, confirmaron que PKA ejerce una regulación negativa sobre estos procesos, específicamente sobre P-Rex1, que se demuestra por la disminución en la migración de células PAE transfectadas con el plásmido que corresponde a la región P-Rex1-amino terminal WT, hecho que no ocurre cuando las células están transfectadas con la mutante no fosforilable P-Rex1 (SA). Esta regulación se explica de la siguiente manera: la activación de P-Rex1 es regulada a la baja cuando la PKA fosforila a este GEF, en el dominio DEP1, específicamente en la S436. Esto sugiere una modulación debida a cambios conformacionales que dan lugar a interacciones intramoleculares que bloquean la actividad catalítica del GEF y que, finalmente, resultan en una regulación negativa de la cascada que conduce, en este caso, a la disminución en la migración celular. Por ello, cuando se utilizó la mutante S436A de P-Rex1, las interacciones intramoleculares en el GEF no se desencadenan debido a que P-Rex1 no pudo ser fosforilado por PKA y, en consecuencia, la regulación negativa de la vía ya no era posible.

Con los resultados que se presentan de este trabajo de investigación, se amplían los hallazgos previos de otros grupos que habían reportado que la PKA regula al GEF P-Rex1 (resultado de experimentos *in vitro*). En concreto, nuestros resultados no sólo confirman que tal regulación existe, sino que además demuestran que es dependiente de una interacción directa, que es recíproca y que a nivel estructural, resulta en la fosforilación del GEF, lo que sugiere el

establecimiento de interacciones intramoleculares que generan arreglos moleculares y nuevos plegamientos que finalmente llevan a la inhibición funcional de P-Rex1. La información previamente disponible estaba basada en experimentos hechos *in vitro* y no revelaba los mecanismos de dicha regulación. De manera interesante, nuestros resultados demuestran que la asociación entre P-Rex1 y la PKA sucede en células que expresan de forma endógena a tales proteínas. Esto fue revelado en modelos de cultivos celulares en donde hay una interacción a través de los dominios PDZ de P-Rex1 con el dominio de unión a AMPc de PRKAR1a (CNB B). También se demostró que en la regulación de PKA sobre P-Rex1, se requiere de mecanismos que van más allá de una simple interacción. Pues como se mostró en este trabajo, la asociación encontrada entre ambas proteínas es tan sólo el inicio de una serie eventos, a los que le sigue la fosforilación de P-Rex1 por PKA y, en consecuencia, el establecimiento de interacciones intramoleculares en P-Rex1 que llevan a su inhibición. Así pues, consideramos que la interacción caracterizada y reportada aquí entre el GEF P-Rex1 y la cinasa PKA resulta muy interesante y novedosa, ya que evidencía un mecanismo de regulación bi-direccional entre las dos proteínas. Por una parte, P-Rex1 es regulado por PKA a través de fosforilaciones que finalmente llevan su inhibición y por tanto se regulan negativamente los eventos que dependen de él. Por otro lado, P-Rex1 ejerce regulación sobre PKA, esto de acuerdo a lo observado en los experimentos de microscopía de fluorescencia, en donde se ve que P-Rex1 al ser activado por SDF-1, se recluta a la membrana celular llevando a la subunidad PRKAR1a asociada a él. Este mecanismo reubica a la PKA en regiones subcelulares en donde la respuesta a estímulos puede ser más eficiente y se pueden llevar a cabo la regulación de proteínas efectoras de una manera muy fina y precisa, coordinada de forma espaciotemporal.

Como se describió anteriormente, existen proteínas llamadas AKAPs cuya función es la localización o reclutamiento de PKA a ciertos compartimentos o regiones subcelulares, lo que facilita la interacción de PKA con sus proteínas sustrato. Se sabe que los AKAPs se asocian a PKA mediante sus subunidades reguladoras y se ha descrito que la asociación se lleva a cabo en la región amino terminal de las subunidades reguladoras RI y RII de la PKA (Huang, Durick, Weiner, Chun, & Taylor, 1997). En nuestro trabajo, describimos que P-Rex1 re-localiza a la PKA a la membrana plasmática, lo que podría abrir un campo nuevo de exploración respecto a la posibilidad de que, gracias a su interacción con P-Rex1, la PKA tenga acceso a sustratos específicos en este entorno, al que accede siendo llevada por P-Rex1. Desde esta perspectiva

funcional, se puede sugerir que P-Rex1 podría tener una función tipo AKAP. Aunque tal posibilidad hay que considerarla con reservas, ya que si tal función existe, también implica diferencias en los mecanismos de interacción que aquí hemos descrito para el reconocimiento de P-Rex1 por la PKA, que ocurre a través del carboxilo terminal de la subunidad reguladora; en tanto que lo tradicionalmente descrito de la interacción entre PKA y sus AKAPs es que ésta ocurre a través de regiones ubicadas en el amino-terminal de las subunidades reguladoras, particularmente del tipo II.

Finalmente, concluimos que el GEF P-Rex1 se asocia a través de sus dominios PDZ con la subunidad reguladora de la cinasa PKA. Siendo capaz de reclutar a la holoenzima que, una vez activada, regula la participación de P-Rex1 en procesos de migración celular, a través de fosforilaciones que conducen a interacciones intramoleculares inhibitorias. Además, las interacciones entre la PKA y el GEF P-Rex1 dan lugar a una regulación bidireccional y espaciotemporal en la que ambas proteínas se ven afectadas. Así pues, de acuerdo a nuestro modelo general, P-Rex1 es un GEF fundamental en la respuesta quimiotáctica promovida por receptores acoplados a proteínas G y su regulación espaciotemporal ocurre de forma muy precisa, y esto se explica porque lleva asociado a su regulador, la PKA.

9. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, en cuanto a la proteína cinasa A, se propone una nueva forma de regulación, esto es, a través de la asociación de subunidades reguladoras de PKA, con proteínas que contengan dominios PDZ. Así, se abre un campo amplio en el que se puede buscar proteínas con dominios PDZ que sean afines a PKA y explorar su relevancia en los procesos de interés, lo cual podrá generar avances en el entendimiento de mecanismos de regulación complejos.

Respecto a la interacción de P-Rex1/PKA, explorar los efectos de la regulación bidireccional encontrados en este trabajo, ahora en un contexto angiogénico en el que se examinen los efectos funcionales causados por mutantes del GEF-P-Rex1 que eviten la fosforilación dependiente de PKA y cuyos resultados evidencien la importancia de la asociación entre ambas proteínas.

Por otra parte, el presente trabajo da base para considerar y estudiar al GEF P-Rex1 como una proteína integradora de señales, no solamente respecto a su actividad de GEF, sino como una proteína de importancia en la regulación de proteínas en cuanto a su localización celular, confiriéndole a P-Rex1 la posibilidad de ejercer un papel dual en la transducción de señales.

10. REFERENCIAS

- Bakre, M. M., Zhu, Y., Yin, H., Burton, D. W., Terkeltaub, R., Defetos, L. J., & Varner, J. A. (2002). Parathyroid hormone-related peptide is a naturally occurring, protein kinase A-dependent angiogenesis inhibitor. *Nat Med*, 8(9), 995-1003. doi:10.1038/nm753
- Balkwill, F. (2004). *The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Barber, M. A., & Welch, H. C. (2006). PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration. *Bulletin du cancer*, 93(5), 10044-10052.
- Barrio-Real, L., & Kazanietz, M. G. (2012). Rho GEFs and cancer: linking gene expression and metastatic dissemination. *Sci. Signal.*, 5(244), pe43-pe43.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*, 3(6), 401-410.
- Bos, J. L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*, 49(17), 4682-4689.
- Bos, J. L., Rehmann, H., & Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129(5), 865-877.
- Bossis, I., & Stratakis, C. A. (2004). Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology*, 145(12), 5452-5458.
- Burdyga, A., Conant, A., Haynes, L., Zhang, J., Jalink, K., Sutton, R., . . . Tepikin, A. (2013). cAMP inhibits migration, ruffling and paxillin accumulation in focal adhesions of pancreatic ductal adenocarcinoma cells: effects of PKA and EPAC. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), 2664-2672.
- Carretero-Ortega, J., Walsh, C. T., Hernández-García, R., Reyes-Cruz, G., Brown, J. H., & Vázquez-Prado, J. (2010). Phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Molecular pharmacology*, 77(3), 435-442.
- Cook, D., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2014). Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*, 33(31), 4021-4035.
- Cotton, M., & Claing, A. (2009). G protein-coupled receptors stimulation and the control of cell migration. *Cellular signalling*, 21(7), 1045-1053.
- Chávez-Vargas, L., Adame-García, S., Cervantes-Villagrana, D., Castillo-Kauil, A., Bruystens G.H., Fukuhara, S., Taylor, S., Mochizuki, N., Reyes-Cruz, G., and Vázquez-Prado, J. (2016). Protein Kinase A (PKA) Type I Interacts with P-Rex1, a Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor, effect on pka localization and P-Rex1 signaling. *Journal of biological chemistry*, 291 (12), 6182-6199.
- Dell'Acqua, M. L., & Scott, J. D. (1997). Protein kinase A anchoring. *Journal of Biological Chemistry*, 272(20), 12881-12884.
- Diviani, D., Baisamy, L., & Appert-Collin, A. (2006). AKAP-Lbc: a molecular scaffold for the integration of cyclic AMP and Rho transduction pathways. *European journal of cell biology*, 85(7), 603-610.
- Diviani, D., Soderling, J., & Scott, J. D. (2001). AKAP-Lbc anchors protein kinase A and

- nucleates $G\alpha_{12}$ -selective Rho-mediated stress fiber formation. *Journal of biological chemistry*, 276(47), 44247-44257.
- Donald, S., Humby, T., Fyfe, I., Segonds-Pichon, A., Walker, S. A., Andrews, S. R., Welch, H. C. (2008). P-Rex2 regulates Purkinje cell dendrite morphology and motor coordination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(11), 4483-4488. doi:10.1073/pnas.0712324105
- Dormond, O., Bezzi, M., Mariotti, A., & Ruegg, C. (2002). Prostaglandin E2 promotes integrin $\alpha_5\beta_3$ -dependent endothelial cell adhesion, Rac-activation, and spreading through cAMP/PKA-dependent signaling. *J Biol Chem*, 277(48), 45838-45846. doi:10.1074/jbc.M209213200
- Dorsam, R. T., & Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews cancer*, 7(2), 79-94.
- Dovas, A., & Couchman, J. R. (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochemical Journal*, 390(1), 1-9.
- Ellenbroek, S. I., & Collard, J. G. (2007). Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clinical & experimental metastasis*, 24(8), 657-672.
- Fossberg, T. M., Døskeland, S. O., & Ueland, P. M. (1978). Protein kinases in human renal cell carcinoma and renal cortex: A comparison of isozyme distribution and of responsiveness to adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate. *Archives of biochemistry and biophysics*, 189(2), 372-381.
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 362-374.
- Goicoechea, S. M., Awadia, S., & Garcia-Mata, R. (2014). I'm coming to GEF you: regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell adhesion & migration*, 8(6), 535-549.
- Hernández-García, R., Iruela-Arispe M.L., Reyes-Cruz, G., and Vázquez-Prado, J. (2015). Endothelial RhoGEFs: A systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, 74(2015), 60-72.
- Hernández-Negrete, I., Carretero-Ortega, J., Rosenfeldt, H., Hernández-García, R., Calderón-Salinas, J. V., Reyes-Cruz, G., . . . Vázquez-Prado, J. (2007). P-Rex1 links mammalian target of rapamycin signaling to Rac activation and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23708-23715.
- Hill, K., Krugmann, S., Andrews, S. R., Coadwell, W. J., Finan, P., Welch, H. C., . . . Stephens, L. R. (2005). Regulation of P-Rex1 by phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate and G $\beta\gamma$ subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4166-4173.
- Howe, A. K., Baldor, L. C., & Hogan, B. P. (2005). Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14320-14325.
- Huang, L. J.-s., Durick, K., Weiner, J. A., Chun, J., & Taylor, S. S. (1997). Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 8057-8064.
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 247-269.
- Jeleń, F., Oleksy, A., Śmietana, K., & Otlewski, J. (2003). PDZ domains-common players in the cell signaling. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 985-1017.
- Kim, C., Cheng, C. Y., Saldanha, S. A., & Taylor, S. S. (2007). PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation. *Cell*, 130(6), 1032-1043.

- Lappano, R., & Maggiolini, M. (2011). G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, *10*(1), 47-60.
- Lauffenburger, D. A., & Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, *84*(3), 359-369.
- Ledezma-Sánchez, B. A., García-Regalado, A., Guzmán-Hernández, M. L., & Vázquez-Prado, J. (2010). Sphingosine-1-phosphate receptor S1P 1 is regulated by direct interactions with P-Rex1, a Rac guanine nucleotide exchange factor. *Biochemical and biophysical research communications*, *391*(4), 1647-1652.
- Lee, J.-W., Lee, J., & Moon, E.-Y. (2014). HeLa human cervical cancer cell migration is inhibited by treatment with dibutyryl-cAMP. *Anticancer research*, *34*(7), 3447-3455.
- Lindsay, C. R., Lawn, S., Campbell, A. D., Faller, W. J., Rambow, F., Mort, R. L., . . . Ridgway, R. A. (2011). P-Rex1 is required for efficient melanoblast migration and melanoma metastasis. *Nature communications*, *2*, 555.
- Mavrakis, M., Lippincott-Schwartz, J., Stratakis, C. A., & Bossis, I. (2006). Depletion of type IA regulatory subunit (RI α) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. *Human molecular genetics*, *15*(19), 2962-2971.
- McDaid, H., Cairns, M., Atkinson, R., McAleer, S., Harkin, D., Gilmore, P., & Johnston, P. (1999). Increased expression of the RI α subunit of the cAMP-dependent protein kinase A is associated with advanced stage ovarian cancer. *British journal of cancer*, *79*(5-6), 933.
- Michel, J. J. C., & Scott, J. D. (2002). AKAP mediated signal transduction. *Annual review of pharmacology and toxicology*, *42*(1), 235-257.
- Munoz-Chapuli, R., Quesada, A., & Medina, M. A. (2004). Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *61*(17), 2224-2243.
- Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., . . . Wagner, S. N. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *nature*, *410*(6824), 50-56.
- NESTEROVA, M., & CHO-CHUNG, Y. S. (2000). Oligonucleotide sequence-specific inhibition of gene expression, tumor growth inhibition, and modulation of cAMP signaling by an RNA-DNA hybrid antisense targeted to protein kinase A RI α subunit. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, *10*(6), 423-433.
- Newlon, M. G., Roy, M., Morikis, D., Hausken, Z. E., Coghlan, V., Scott, J. D., & Jennings, P. A. (1999). The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nature Structural & Molecular Biology*, *6*(3), 222-227.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., & Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, *2*(3), 213.
- Qin, J., Xie, Y., Wang, B., Hoshino, M., Wolff, D. W., Zhao, J., . . . Tu, Y. (2009). Upregulation of PIP3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene*, *28*(16), 1853-1863.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, *70*(3), 401-410.

- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., . . . Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, *302*(5651), 1704-1709.
- Schmidt, A., & Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & development*, *16*(13), 1587-1609.
- Seoane, S., Montero, J. C., Ocaña, A., & Pandiella, A. (2010). Effect of multikinase inhibitors on caspase-independent cell death and DNA damage in HER2-overexpressing breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, *102*(18), 1432-1446. doi:10.1093/jnci/djq315
- Smith, F. D., Langeberg, L. K., Cellurale, C., Pawson, T., Morrison, D. K., Davis, R. J., & Scott, J. D. (2010). AKAP-Lbc enhances cyclic AMP control of the ERK1/2 cascade. *Nature Cell Biology*, *12*(12), 1242-1249.
- Smith, F. D., Langeberg, L. K., & Scott, J. D. (2011). Plugging PKA into ERK scaffolds. *Cell cycle*.
- Sosa, M. S., Lopez-Haber, C., Yang, C., Wang, H., Lemmon, M. A., Busillo, J. M., . . . Yagi, H. (2010). Identification of the Rac-GEF P-Rex1 as an essential mediator of ErbB signaling in breast cancer. *Molecular cell*, *40*(6), 877-892.
- Takahashi, M., Dillon, T. J., Liu, C., Kariya, Y., Wang, Z., & Stork, P. J. (2013). Protein kinase A-dependent phosphorylation of Rap1 regulates its membrane localization and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(39), 27712-27723.
- Taskén, K., & Aandahl, E. M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, *84*(1), 137-167. doi:10.1152/physrev.00021.2003
- Taylor, S. S., Ilouz, R., Zhang, P., & Kornev, A. P. (2012). Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. *Nature reviews Molecular cell biology*, *13*(10), 646-658.
- Tortora, G., & Ciardiello, F. (2002). Protein kinase A as target for novel integrated strategies of cancer therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *968*(1), 139-147.
- van Buul, J. D., Geerts, D., & Huveneers, S. (2014). Rho GAPs and GEFs: controlling switches in endothelial cell adhesion. *Cell Adh Migr*, *8*(2), 108-124.
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, *294*(5545), 1299-1304.
- Walsh, D. A., Perkins, J. P., & Krebs, E. G. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*, *243*(13), 3763-3765.
- Waters, J. E., Astle, M. V., Ooms, L. M., Balamatsias, D., Gurung, R., & Mitchell, C. A. (2008). P-Rex1 - a multidomain protein that regulates neurite differentiation. *J Cell Sci*, *121*(Pt 17), 2892-2903. doi:10.1242/jcs.030353
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Ellson, C. D., Ferguson, G. J., Andrews, S. R., Erdjument-Bromage, H., . . . Stephens, L. R. (2002). P-Rex1, a PtdIns (3, 4, 5) P 3-and Gβγ-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*, *108*(6), 809-821.
- Wertheimer, E., Gutierrez-Uzquiza, A., Rosemblyt, C., Lopez-Haber, C., Sosa, M. S., & Kazanietz, M. G. (2012). Rac signaling in breast cancer: a tale of GEFs and GAPs. *Cellular signalling*, *24*(2), 353-362.
- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews*, *85*(4), 1159-1204.

- Yoshizawa, M., Kawauchi, T., Sone, M., Nishimura, Y. V., Terao, M., Chihama, K., . Hoshino, M. (2005). Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration. *J Neurosci*, 25(17), 4406-4419. doi:10.1523/JNEUROSCI.4955-04.2005
- Zhao, T., Nalbant, P., Hoshino, M., Dong, X., Wu, D., & Bokoch, G. M. (2007). Signaling requirements for translocation of P-Rex1, a key Rac2 exchange factor involved in chemoattractant-stimulated human neutrophil function. *Journal of leukocyte biology*, 81(4), 1127-1136.
- Zimmerman, N. P., Roy, I., Hauser, A. D., Wilson, J. M., Williams, C. L., & Dwinell, M. B. (2015). Cyclic AMP regulates the migration and invasion potential of human pancreatic cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 54(3), 203-215.